

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**



**Regulación de la movilidad mediada por
flagelos en *Pseudomonas fluorescens* F113**

Ana Navazo Alonso

Madrid, 2011

Memoria presentada por la Licenciada en Biología
Ana Navazo Alonso para optar al Título de Doctor

Fdo. Ana Navazo Alonso

Los directores

Fdo. Dra. Marta Martín Basanta
Profesor Titular
Departamento de Biología
Universidad Autónoma de Madrid

Fdo. Dr. Rafael Rivilla Palma
Profesor Titular
Departamento de Biología
Universidad Autónoma de Madrid

Agradecimientos

A mis directores de Tesis, Rafa y Marta, por acogerme en su grupo de trabajo, por darme la oportunidad de estar aquí y formarme en el ámbito investigador, desarrollar mi espíritu crítico y capacidad científica.

A mi amiga y principal apoyo, la persona de la que y con la que más he aprendido en este largo camino. Gracias Emma por todos los momentos, por los congresos, por los aperitivos, todos los desayunos, las charlas y discusiones, por tu figura 24 que es tan bonita!, por tus consejos, pero gracias sobre todo por estar ahí siempre, también cuando las cosas no son tan bonitas ni van tan bien. Porque no hay nada mejor que poder compartir tu tiempo, tu trabajo, tu vida, con personas con las que te entiendes y quieres. También a Fran, por todo lo que nos has ayudado, por tu tiempo y tus enseñanzas, y por esos días tan graciosos que tienes. Te acuerdas cuando llegamos y te hacíamos caso en todo, eh? Que tiempos! Hemos hecho un buen equipo, ahora a ver qué nos deparará el futuro... A mi otra amiga, sí María, cómo iba yo a pensar que te echaría tanto de menos? Con lo que mandabas y ese genio que traías y mira! Eres de esas personas que te haces sentir cerca aunque estés lejos lejos. Gracias por todos los momentos divertidos que nos has hecho pasar y por ser siempre un apoyo. Y a Juan, por integrarnos y cuidarnos, porque siempre estás dispuesto a echar una mano y ayudar, a implicarte con la gente, de verdad muchas gracias.

A los nuevos rizosféricos, Isidro e Irene, se nota que valéis mucho, habéis llegado con ganas y espero que tengáis mucha suerte y que podáis dedicaros a esto si es lo que queréis. Mucho ánimo! Y a Elena que su trabajo ha sido muy importante para algunos de los resultados aquí reflejados. También a los rizosféricos antiguos, a Roke y Dani, que me acuerdo de vosotros más de lo que hubiese creído. Para mí los dos representáis lo que es ser un buen compañero, cada uno a su manera, siempre estabais ahí para que fuésemos a contaros penas, para dar un consejo, para echar un cable. Y a Celia, una de las investigadoras más trabajadoras e incansables, gracias por enseñarme tantas cosas.

A todos los miembros del departamento que han colaborado de una manera u otra en mi formación, algunos más en la parte investigadora y otros más en la parte docente. Muchos de vosotros fuisteis profesores míos a lo largo de la carrera. Me acuerdo especialmente de las clases de Fisiología Vegetal de Eduardo Fernández y de Alfonso, con quienes además he tenido la oportunidad de poder vivir la experiencia “al otro lado”, compartir prácticas y seguir aprendiendo de ellos en esta etapa. También a todos mis compañeros de prácticas, porque cada uno sois y enseñáis de una manera...tengo que agradecer a muchos estos buenos recuerdos, a Flor, a Luis, a Paquita, a Arse, a Eduardo Marco, y especialmente

quería agradecerse a Cris, por las prácticas y porque siempre tienes un rato para hablar con todos, para escuchar a la gente, e intentas que toda la gente se sienta bien...y a Javi, por todas las charlas y las historietas, y por lo bien que me lo pasé contigo en prácticas, que hasta el último día me sacaste los colores! Y en la parte no docente, quería daros las gracias a Paqui y a Paco, porque hacéis que todo sea más ameno, y que nos sintamos como en casa, y por vuestro humor y risas en los desayunos y en las celebraciones. Y a Mari-perri, la super-profe, por los buenos ratos que pasamos con su humor y su tomate!

Y ya fuera de aquí, tengo que agradecer al grupo de la Estación Experimental del Zaidín de Granada, y a mi otro jefe Manolo, que me hicieron sentir allí como una más. Y sobretodo a mi amiga Fátima, porque además de los congresos tuve la suerte de poder coincidir allí contigo, de conocerte mejor y contarnos nuestras historias durante las miles de horas que estuvimos haciendo fotos en el microscopio...Mil gracias! También a los de fuera que estuvieron por aquí, la argentina, la granaína y el sevillano, gracias a los tres por los buenos momentos que hemos pasado.

Dicen que cada uno de nosotros estamos constituidos sobre todo por partes de otros, de personas a las que queremos y con las que compartimos nuestro día a día. Por eso, quiero dar las gracias a otra gran parte de mi vida, mis amigos. Gracias a todos porque habéis estado pendientes de todo esto, por haberme entendido, cuidado y apoyado siempre, por preocuparos por todo y por mí, gracias a todos. No me olvido de mis otros amigos, que sois casi mi familia siempre juntos desde que Blanca y nosotros éramos pequeños, y también de mi familia adjunta y de Paola, que habéis estado pendientes de mí todo este tiempo.

Y por último al otro gran pilar, que es toda mi familia. Quería empezar dando las gracias a mis abuelos, por habernos cuidado a todos siempre, por seguir preocupándose de nosotros aún, por darnos todo lo que ha estado en vuestra mano, por cuidarnos y querernos tanto. También a todos mis tíos y tías porque todos nos habéis enseñado, aunque suene a tópico, con vuestro ejemplo, a ser trabajadores, a estar juntos y revueltos, a apoyarnos unos a otros, a saber estar en todos los momentos...gracias a todos.

Por supuesto a mis padres, por aguantarme tantos años, por animarme siempre, porque tengo la gran suerte de saber que siempre estáis ahí para lo que sea, para lo que necesite, mil gracias a los dos! Y a mi hermano, porque seguimos manteniendo nuestra especial complicidad...espero que os hayan gustado nuestros bichos!

...y a Adri...

Índice

Resumen	3
----------------------	----------

Introducción

1. La rizosfera	7
2. Los microorganismos de la rizosfera	8
2.1. PGPR.....	10
2.1.1. Importancia de las PGPR en la colonización de la rizosfera.....	11
2.1.2. <i>Pseudomonas fluorescens</i> F113.....	11
3. Factores importantes para la colonización de la rizosfera	13
3.1. Movilidad, quimiotaxis y adherencia	14
3.1.1. El flagelo.....	17
3.1.1.1. Estructura del flagelo	18
3.1.1.2. Regulación de la movilidad a nivel de la biosíntesis del flagelo.....	21
3.1.1.3. Regulación de la movilidad tras el ensamblaje del flagelo: el di-GMPc.....	26
3.2. La variación de fase	29
3.3. Sistemas de dos componentes. El sistema de dos componentes GacA/GacS	31

Objetivos.....	39
-----------------------	-----------

Materiales y Métodos

Materiales

1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	43
2. Oligonucleótidos	44
3. Medios de cultivo y para ensayos de actividades enzimáticas.....	46
4. Antibióticos y reactivos de selección	48
5. Reactivos, enzimas, kits y anticuerpos	48
5.1. Reactivos	48
5.2. Enzimas	49
5.3. Kits	49
5.4. Anticuerpos	50
6. Herramientas informáticas.....	51
7. Equipos utilizados en este trabajo	51

Métodos

1. Cultivo de bacterias	52
2. Generación y análisis de mutantes.....	52
2.1. Mutagénesis al azar por inserción de transposones	52
2.2. Construcción de mutantes por mutagénesis dirigida	53
2.3. Construcción de cepas para sobreexpresión de genes	53
2.4. Técnicas utilizadas para generar mutantes y sobreexpresar genes	54
2.4.1. PCR	54
2.4.2. Extracción de ADN genómico y plasmídico	55
2.4.3. Reacciones enzimáticas y purificación del ADN	55
(i) Digestión con enzimas de restricción.....	55

(ii) Purificación de fragmentos de ADN.....	56
(iii) Ligación de fragmentos de ADN.....	56
2.4.4. Electroforesis en geles de agarosa	56
2.4.5. Transformación de cepas de <i>E. coli</i>	57
2.4.6. Conjugación	57
2.4.7. Hibridación del ADN o <i>Southern blot</i>	58
3. Caracterización fenotípica de los mutantes.....	59
3.1. Ensayos de movilidad.....	59
3.2. Identificación de alteraciones en el metabolismo secundario	60
3.3. Ensayos de formación de biopelículas	60
4. Análisis de expresión	61
4.1. Análisis transcripcional.....	61
4.1.1. Extracción de ARN.....	61
4.1.2. Cuantificación, tratamiento con ADNasa y purificación	61
4.1.3. Síntesis de ADNc	62
4.1.4. PCR cuantitativa (qPCR).....	62
4.1.5. Inmunoprecipitación de ARN	63
4.1.6. Ensayos de actividad β -galactosidasa	64
4.2. Análisis traduccional.....	65
4.2.1. Extracción y cuantificación de proteínas	65
4.2.2. Electroforesis de proteínas y <i>Western blot</i>	66
5. Microscopía Confocal.....	67
6. Análisis estadístico	67

Resultados

1. Tres rutas de señalización reprimen de manera independiente la movilidad en <i>P. fluorescens</i> F113	71
1.1. Aislamiento de mutantes por transposición implicados en la represión de la movilidad tipo <i>swimming</i>	71
1.2. Caracterización fenotípica de los mutantes <i>sadB</i> y <i>wspR</i>	72
1.3. SadB y WspR forman parte de rutas de señalización independientes ...	73
1.4. SadB y WspR regulan la movilidad a distintos niveles	74
2. Las rutas de transducción de señales en las que están implicados los sistemas Gac-Rsm y SadB convergen a nivel de AlgU en la regulación de la movilidad en la cepa <i>P. fluorescens</i> F113.....	76
2.1. El sistema Gac regula la movilidad a través de la ruta Rsm	76
2.2. La regulación de <i>fleQ</i> mediada por el sistema Gac es independiente de Vfr, pero depende de AmrZ y AlgU	77
2.3. RsmA se une al ARNm policistrónico de <i>algUmucAB</i>	79
2.4. SadB y GacAS regulan la expresión de <i>algU</i>	80
3. FlgZ integra las señales de los sistemas independientes Wsp y SadC/BifA en la cepa <i>P. fluorescens</i> F113	82
3.1. <i>flgZ</i> es un gen flagelar	82
3.2. FlgZ regula la movilidad integrando la señalización vía di-GMPc de dos sistemas independientes: SadC/BifA y el sistema Wsp	84
3.3. FlgZ regula la movilidad de manera independiente a las rutas en las que están implicados el sistema Gac y la proteína SadB	85
3.4. FlgZ cumple un papel clave en la formación de biopelículas.....	86
3.5. FlgZ se localiza en uno de los polos de la bacteria	87

Discusión

1. La mutación de varios genes que codifican proteínas implicadas en la transducción de señales provoca fenotipos de hipermovilidad.....91
2. Regulación de la biosíntesis del Flagelo 1.....95
3. Regulación a nivel del funcionamiento del flagelo99
4. El movimiento de *Pseudomonas fluorescens* F113 está regulado por una red compleja de señalización104

Conclusiones..... 109

Referencias 113

Índice de Figuras y Tablas

Figuras

Figura 1: Esquema de las interacciones que se producen durante la transducción de señales quimiotácticas bacterianas	15
Figura 2: Esquema de los componentes del cuerpo basal y el gancho del flagelo	19
Figura 3: Esquema de la transcripción jerarquizada de los componentes del flagelo en distintas especies.....	21
Figura 4: Modelo del ensamblaje del flagelo y los genes que se activan en cada paso en <i>P. aeruginosa</i>	24
Figura 5: Esquema de la organización genética de la región localizada entre los genes <i>fliC</i> y <i>fleQ</i>	26
Figura 6: Modelo de la ruta de transducción de señales del sistema de dos componentes GacA/GacS en <i>P. fluorescens</i> CHA0	33
Figura 7: Movilidad de los variantes fenotípicos	35
Figura 8: Movilidad tipo <i>swimming</i> de <i>P. fluorescens</i> F113 y mutantes hipermóviles	73
Figura 9: Movilidad tipo <i>swarming</i> de <i>P. fluorescens</i> F113 y mutantes hipermóviles	74
Figura 10: Producción de flagelina por parte de <i>P. fluorescens</i> F113 y mutantes hipermóviles.....	75
Figura 11: El sistema Gac regula la movilidad a través de la ruta Rsm.....	76
Figura 12: La represión de <i>fleQ</i> mediada por el sistema Gac es independiente de Vfr pero depende de AmrZ y AlgU	78
Figura 13: RsmA se une al ARNm policistrónico de <i>algUmucAB</i>	80
Figura 14: SadB y GacAS regulan la expresión de <i>algU</i>	81
Figura 15: Esquema de los dominios conservados y su homología correspondiente.....	82
Figura 16: Movilidad tipo <i>swimming</i> de <i>P. fluorescens</i> F113 y mutantes relacionados con la síntesis y degradación del di-GMPc	83
Figura 17: RT-PCR de ADNc de la región adyacente al gen <i>flgZ</i>	83
Figura 18: Análisis de la expresión de <i>flgZ</i>	84
Figura 19: Movilidad tipo <i>swimming</i> de <i>P. fluorescens</i> F113 y mutantes en genes de las rutas mediadas por FlgZ, el sistema Gac y la proteína SadB	86

Figura 20: Capacidad de formación de biopelículas de <i>P. fluorescens</i> F113 y mutantes relacionados con la síntesis y degradación del di-GMPc.....	87
Figura 21: Imagen de microscopía confocal de la localización de FlgZ-eCFP en <i>P. fluorescens</i> F113 y derivados	88
Figura 22: Modelo propuesto para explicar la señalización de las rutas Gac/Rsm y SadB en la represión ambiental de la movilidad en <i>P. fluorescens</i> F113	98
Figura 23: Modelo propuesto para explicar la señalización de las rutas SadC/BifA y Wsp en la represión de la movilidad en <i>P. fluorescens</i> F113	104
Figura 24: Modelo global de la regulación ambiental de la movilidad en la cepa <i>P. fluorescens</i> F113	105

Tablas

Tabla 1: Cepas y plásmidos utilizados	43
Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	45
Tabla 3: Composición de los medios de cultivo utilizados	47
Tabla 4: Composición de los medios utilizados en ensayos enzimáticos y de movilidad.....	47
Tabla 5: Programa utilizado para la amplificación por PCR.....	54
Tabla 6: Soluciones utilizadas para la electroforesis en geles de agarosa.....	57
Tabla 7: Soluciones utilizadas para <i>Southern blot</i>	58
Tabla 8: Programa utilizado para descartar contaminación de ARN con ADN.....	62
Tabla 9: Programa utilizado para la amplificación por qPCR.....	62
Tabla 10: Soluciones utilizadas para el análisis transcripcional	63
Tabla 11: Soluciones utilizadas para el análisis traduccional	65
Tabla 12: Composición de los geles desnaturizantes de poliacrilamida	66
Tabla 13: Mutantes hipermóviles aislados	72

Resumen

La rizosfera, porción del suelo íntimamente asociada a la raíz de las plantas, es un nicho ecológico adecuado para multitud de microorganismos, debido a los exudados que la planta secreta a través de sus raíces. Estos microorganismos pueden establecer relaciones beneficiosas con la planta, como es el caso de las PGPR, pero para que puedan ejercer su acción es necesario que sean capaces de colonizar eficientemente la rizosfera. Entre otros, se ha descrito que la movilidad, la adhesión y la acción de enzimas con actividad recombinasa del ADN, son importantes para llevar a cabo dicha colonización. Durante este proceso se ha observado que en la rizosfera de alfalfa, *P. fluorescens* F113 sufre variación fenotípica, caracterizada por la aparición de variantes más móviles que la cepa silvestre, y que la desplazan del ápice radicular en ensayos de colonización competitiva. Estos variantes hipermóviles portan entre otras, mutaciones en el sistema de dos componentes GacA/GacS, regulador del metabolismo secundario y que reprime la capacidad de movimiento en F113. Mediante mutagénesis al azar con transposones encontramos cinco mutantes que mostraban mayor movilidad que la cepa silvestre y presentaban interrumpidos genes cuyos productos presentaban homología con las proteínas KinB, SadB, WspC, WspE y WspR. KinB es la proteína sensora de un sistema de dos componentes que regula la síntesis del polisacárido alginato. Mientras que SadB y WspR parecen estar relacionados con el metabolismo del segundo mensajero di-guanosín-monofosfato cíclico (di-GMPc). Los ensayos de epistasia demostraron que las rutas en las que participan los genes *gacS*, *sadB* y *wspR* son independientes, ya que tanto los dobles como el triple mutante mostraron un fenotipo aditivo en cuanto a la movilidad tipo *swimming* y *swarming*. Además, la expresión del gen *fleQ*, el regulador principal de los componentes de la síntesis del flagelo en *Pseudomonas* y de FliC (flagelina), era mayor en los mutantes *gacS*⁻ y *sadB*⁻ con respecto a la estirpe silvestre, no existiendo diferencias entre la cepa silvestre y el mutante *wspR*⁻.

Esta cepa presenta genes que codifican proteínas Rsm, y ARNs *rsm* de pequeño tamaño, homólogos a los descritos en otras *Pseudomonas*. La sobreexpresión de proteínas Rsm en F113 produce un incremento en la movilidad y en la expresión de los genes *fleQ* y *fliC*, un fenotipo idéntico al de los mutantes *gac*⁻. Al haberse descrito AmrZ como un represor de *fleQ* en *P. aeruginosa*, y a AlgU (σ^{22}), como el factor sigma necesario para la expresión de *amrZ*, se construyeron mutantes en estos genes en *P. fluorescens* F113, mostrando ambos un fenotipo hipermóvil similar y altos

niveles de expresión de *fleQ* y *fliC*. En cuanto a los ensayos de interacción génica comprobamos que *algU*, *amrZ* y *gacS* actúan en la misma ruta de regulación de la movilidad, al igual que los genes *algU*, *amrZ* y *sadB*. El doble mutante *gacS⁻sadB⁻* mostraba un fenotipo de movilidad tipo *swimming* aditivo con respecto al de los mutantes simples, por tanto, las rutas en las que están implicados la proteína SadB y el sistema Gac/Rsm convergen a nivel de la regulación de *algU*.

En cuanto a la ruta en la que participa el sistema Wsp, se ha descrito que WspR, la proteína efectora del sistema, presenta actividad diguanilato ciclasa, aumentando los niveles intracelulares de di-GMPc. Proteínas con dominios PilZ son capaces de unir di-GMPc y afectar a la velocidad de rotación del flagelo en otras especies. El genoma de *P. fluorescens* F113 presenta un gen denominado *flgZ*, cuyo producto contiene un dominio PilZ, y es homólogo a la proteína YcgR de enterobacterias. Además, mediante microscopía confocal comprobamos que FlgZ se sitúa en el polo flagelado de la bacteria, siendo su localización dependiente de los niveles de di-GMPc. Sabiendo que tanto el sistema Wsp, como el formado por SadC/BifA, con actividades diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa respectivamente modulan los niveles de di-GMPc en otras pseudomonas, construimos mutantes simples y dobles en estos genes. Mediante análisis genético comprobamos que SadC y BifA forman parte de una única vía de regulación de la movilidad, y que la proteína FlgZ integra las señales de las rutas en las que están implicados de forma independiente los sistemas Wsp y SadC/BifA, siendo estas rutas independientes de aquellas en las que participan el sistema Gac y SadB. En cuanto a la formación de biopelículas los mutantes *wspR⁻* y *sadC⁻* presentan una menor capacidad de adhesión al sustrato, mientras que en *bifA⁻* esta capacidad es mucho mayor. El hecho de que los dobles mutantes *wspR⁻flgZ⁻*, *sadC⁻flgZ⁻* y *bifA⁻flgZ⁻* muestren el mismo fenotipo de adhesión entre sí, y que el mutante *flgZ⁻* parece indicar que la proteína FlgZ tiene un papel clave en la transición de los estilos de vida de móvil a sésil en la cepa *P. fluorescens* F113.

Así, podemos afirmar que la movilidad en la cepa *P. fluorescens* F113 se encuentra reprimida por múltiples rutas de señalización que forman en conjunto una compleja red de regulación a varios niveles: biosíntesis de flagelos y control de su funcionalidad.

Introducción

1. La rizosfera

La rizosfera es la zona del suelo que se encuentra influenciada por la raíz de la planta y constituye un nicho ecológico adecuado para multitud de microorganismos debido a que la planta, a través de sus raíces, secreta compuestos que pueden ser utilizados como nutrientes por las distintas comunidades que allí se establezcan.

Las funciones de la raíz no se limitan por tanto al anclaje de la planta al suelo y a la captación de agua y nutrientes, sino que a través de sus exudados radiculares, la planta es capaz de modificar las condiciones físico-químicas del suelo, así como de establecer una comunicación química con los microorganismos presentes en él, alterando la población microbiana de manera directa o indirecta (Dutta y Podile, 2010). Variaciones en el pH del suelo pueden hacer que algunos nutrientes o iones estén o dejen de estar disponibles tanto para la planta como para el resto de organismos, y por tanto determinará las poblaciones de microorganismos que se establecerán en ese suelo. Además, la presencia de determinados iones, como es el caso del fosfato inorgánico, reprime la síntesis de antibióticos por parte de rizobacterias, lo que tendría un efecto directo sobre la capacidad de biocontrol de la población (Duffy y Défago, 1999). Se sabe que estos exudados son capaces de modular los niveles de expresión de algunos genes en los microorganismos de la rizosfera, como es el caso de azúcares y ácidos orgánicos liberados por el sistema radicular de plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum*), que aumenta la actividad antifúngica de determinadas bacterias en la rizosfera (Kravchenko y col., 2003). A su vez, el estado fisiológico de la planta, la presencia de microorganismos y la presencia de productos sintetizados por las rizobacterias como 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) o fenacinas, así como el sustrato de crecimiento, afectan a la composición de los exudados (Lipton y col., 1987; Meharg y Killham, 1995; Phillips y col., 2004; Kamilova y col., 2008).

Los exudados radiculares suponen una importante fuente de carbono y energía, ya que una cantidad sustanciosa del carbono fijado por la planta, entre el 5-21% es secretado (Marschner, 1995), convirtiendo el suelo rizosférico en un nicho muy interesante nutricionalmente para los microorganismos que habitan en él. Los compuestos mayoritarios liberados por las raíces de las plantas incluyen aminoácidos, monosacáridos y ácidos orgánicos (Phillips y Streit, 1995), aunque también son secretados otro tipo de compuestos como ácidos grasos, ácidos nucleicos, reguladores del crecimiento, esteroides, otros azúcares y vitaminas (Uren, 2007). En cuanto al uso

de dichos exudados por parte de las rizobacterias, se ha descrito que para la colonización competitiva de la rizosfera de plantas de tomate por *Pseudomonas*, la utilización de azúcares exudados no es una característica determinante (Lugtenberg y col., 1999), mientras que sí lo es el uso de ácidos orgánicos exudados. Estos estudios abren la posibilidad de elegir parejas de planta-microorganismo basándonos en la composición de los exudados y la tasa de crecimiento del microorganismo en función de la fuente principal de carbono exudado (Lugtenberg y col., 2001).

2. Los microorganismos de la rizosfera

Como ya se ha comentado, la rizosfera es una zona de intensa actividad biológica microbiana, tanto que se ha observado que el número de bacterias encontradas en suelo rizosférico es entre uno y dos órdenes de magnitud superior al de suelo no rizosférico (Bazin y col., 1990; Schlöter y col., 1997; Molina y col., 2000; Morgan y col., 2005), siendo aun 100 veces menor que en los cultivos con los que se trabaja en el laboratorio (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Plantas y microorganismos interactúan en la rizosfera en los dos sentidos. Por una parte, se ha descrito que las plantas pueden producir y secretar varios compuestos que mimetizan las señales de *quorum sensing* (QS) de bacterias, pudiendo alterar las actividades bacterianas en la rizosfera (Bauer y Mathesius, 2004), ya que el QS es el principal mecanismo de comunicación y regulación en estas poblaciones, para adaptar su metabolismo a las condiciones del medio o a cambios en el ambiente (Whitehead y col., 2001). Los microorganismos utilizan los exudados radiculares de la planta como nutrientes, mientras que a su vez, pueden alterar el metabolismo de las plantas a través de distintos compuestos secretados al medio. Estos compuestos pueden ser detectados directamente por la planta (como nutrientes u hormonas), por otras bacterias de la microcolonia (por ejemplo moléculas señal del QS), o por otros organismos presentes en la rizosfera (antibióticos o antifúngicos, entre otros). Así se ha descrito que su acción no sólo afecta a las relaciones planta-microorganismo, sino también planta-insecto, induciendo incluso resistencia frente a ellos o frente a virus patógenos que utilizan a los insectos como vectores para su propagación (Zehnder y col., 1997; Van Loon, 2007).

Dentro de los microorganismos asociados a la rizosfera podemos distinguir entre otros, dos grupos: beneficiosos y patógenos, que tienen la capacidad de influir en el crecimiento de las plantas en primera instancia, y finalmente en el rendimiento de los cultivos (Dutta y Podile, 2010). Para que un organismo sea considerado beneficioso ha de promover de alguna manera el crecimiento de la planta y su salud, y pueden clasificarse en (i) descomponedores de materia orgánica, (ii) rizobacterias y hongos que promueven directamente el crecimiento vegetal, y (iii) hongos y bacterias antagonistas de patógenos de la raíz. Algunos de estos organismos son capaces tanto de promover el crecimiento vegetal, como de proteger a la planta frente a enfermedades, actuando como agentes de biocontrol (Barea y col., 2005). Para que puedan ejercer su efecto beneficioso en el ambiente radicular, han de ser competentes, es decir, tienen que ser capaces de competir con el resto de microorganismos de la rizosfera por los exudados secretados por la planta, así como por la ocupación de los lugares físicos del sistema radicular. Los principales sitios para el establecimiento de estos microorganismos son las uniones entre células epidérmicas y las zonas de aparición de las raíces laterales. La baja colonización del rizoplasma se consideraba en el pasado un factor que podía estar limitando la eficacia de biocontrol (Schipper y col., 1987; Weller, 1988), y de hecho, se ha comprobado que la colonización de la raíz es necesaria para que se puedan llevar a cabo determinados mecanismos de biocontrol, como los que están mediados por antibiosis o competición por nutrientes y nichos (Chin-A-Woeng y col., 2000; Kamilova y col., 2005; Pliego y col., 2007).

Taxonómicamente podemos distinguir dos grandes grupos entre los microorganismos beneficiosos que pueden habitar en esta región: hongos y bacterias. Estos a su vez pueden ser simbióticos, formando verdaderos órganos en asociación con la raíz de la planta, como en el caso de las bacterias pertenecientes al grupo de rizobiales; o de vida libre, que ejercen su acción aumentando la disponibilidad de determinados nutrientes para la planta, y/o impidiendo la acción de organismos patógenos sobre esta.

En cuanto a las micorrizas representan un componente vital en los ecosistemas, y se encuentran en más del 80% de las plantas terrestres, denominándose micorrizosfera a la zona del suelo influenciada por la raíz y los hongos micorrícicos (Smith y Read, 2008). Uno de sus principales efectos es el aumento de la superficie en contacto con el suelo, lo que favorece finalmente una mejora en la captación de nutrientes. (Thompson y Cunningham, 2002).

2.1. PGPR

La primera evidencia de la existencia de microorganismos del suelo que favorecían de alguna manera el desarrollo de las plantas data de 1938, cuando se observa que el porcentaje de semillas de césped germinadas en suelo no estéril era mayor que el de suelo estéril (Van Luijk, 1938).

Las PGPR (del inglés *plant growth-promoting rhizobacteria*), son bacterias de vida libre que colonizan la rizosfera (Kloepper y Schroth, 1978), y que son capaces de mejorar el estado de las plantas y aumentar la productividad en los cultivos (Kloepper y col., 1989). Para que una bacteria sea considerada una PGPR debe cumplir las siguientes características: (i) ha de colonizar eficientemente la raíz, (ii) debe ser capaz de sobrevivir y multiplicarse en microhábitats asociados con la superficie de la raíz, en competición con otros microorganismos, al menos el tiempo necesario para promover el crecimiento y la protección de la planta, y (iii) debe promover finalmente el crecimiento vegetal (Barea y col., 2005). Existen diversos grupos bacterianos que actúan como PGPR, pero los dos géneros mayoritarios son *Bacillus* y *Pseudomonas* (Podile y Kishore, 2006). Estas rizobacterias pueden actuar interviniendo de forma directa o indirecta sobre el desarrollo de las plantas.

Son mecanismos directos aquéllos en los que las rizobacterias promueven el crecimiento de la planta aún en ausencia de patógenos (Van Loon, 2007). Dependiendo del mecanismo que utilicen se pueden clasificar en cuatro grupos (Lugtenberg y Kamilova, 2009): (i) biofertilizadores si proporcionan algún tipo de nutriente limitante, que al aumentar su concentración, estimule el crecimiento de la planta; (ii) rizadorremediadores, aquellos microorganismos que son capaces de degradar e incluso mineralizar compuestos orgánicos, difícilmente degradables de suelos contaminados; (iii) fitoestimuladores capaces de producir sustancias que favorecen el crecimiento de la planta, como fitohormonas (Kravchenko y col., 2004; Kamilova y col., 2006); o (iv) de control de la respuesta de la planta al estrés, mediante la disminución de los niveles de etileno por parte de PGPR que sintetizan la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa (ACC deaminasa), capaces de degradar el precursor del etileno, ACC, en 2-oxobutanoato y NH₃ (Glick 2005; Glick y col., 2007).

Por otro lado, se consideran mecanismos indirectos aquéllos en los que la PGPR libera determinados metabolitos al medio, que eliminan o no permiten el crecimiento de

patógenos, lo que supone finalmente una mejora para la planta. Estos mecanismos indirectos se denominan mecanismos de biocontrol y entre ellos podemos distinguir biocontrol por antagonismo, por interferencia con la molécula señal, por predación y parasitismo, por inducción de resistencia sistémica, por competición por nutrientes y nicho, y por interferencia en la supervivencia, germinación o esporulación del patógeno (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

2.1.1. Importancia de las PGPR en la colonización de la rizosfera

El control biológico por parte de las PGPR puede ser debido a uno o varios de los mecanismos descritos anteriormente, pero para que puedan llevar a cabo su efecto beneficioso es necesario que la bacteria sea capaz de colonizar eficientemente la rizosfera (Babalola, 2010). La colonización de la rizosfera es un mecanismo complejo debido a la interacción de los microorganismos entre sí y con otros organismos que viven asociados a la planta, la planta y las propias características específicas del suelo. No obstante, su estudio es de gran interés para la utilización de microorganismos como inoculantes en tecnologías agrícolas y de medio ambiente. El establecimiento de una población suficiente en la rizosfera, la compatibilidad de las PGPR con los exudados y otros compuestos liberados por la planta, así como con otros microorganismos de la rizosfera, que directa o indirectamente están cambiando el ambiente rizosférico, son factores clave para el éxito de la PGPR (Dutta y Podile, 2010). Las pseudomonas, por su gran versatilidad metabólica, son uno de los mejores colonizadores de la rizosfera y están siendo utilizadas como microorganismos modelo en estudios de colonización (Lugtenberg y col., 2001).

2.1.2. *Pseudomonas fluorescens* F113.

La cepa con la que se ha llevado a cabo este estudio es *Pseudomonas fluorescens* F113, que fue aislada de la rizosfera de remolacha (*Beta vulgaris*) (Shanahan y col., 1992). Pertenece a la subdivisión de las γ -Proteobacteria, familia Pseudomonadaceae, y al género *Pseudomonas*, y dentro de este, al subgrupo de las pseudomonas fluorescentes. Este grupo se caracteriza principalmente por ser bacilos gram negativos, móviles con flagelación polar, quimioorganotrofos, y aeróbicos estrictos, aunque en ciertos casos pueden usar el nitrato como aceptor de electrones permitiendo una cierta actividad metabólica en condiciones anaeróbicas (Vander Wauven y col., 1984). Son

microorganismos no esporulantes, con actividad catalasa positiva, y un contenido en pares de bases GC en su ADN entre 58-69% (Palleroni, 2008). Deben su nombre a la producción de pigmentos verde amarillentos que fluorescen cuando son excitados a bajas longitudes de onda. Algunos de los miembros de este grupo son importantes patógenos de humanos, animales y plantas, y causan también el deterioro de los alimentos; mientras otros actúan ejerciendo efectos beneficiosos sobre los organismos vegetales. Son especies representativas de este grupo: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas fluorescens* (Haas y Défago, 2005; Mercado-Blanco y Bakker, 2007).

Las pseudomonas son considerados organismos ubicuos, y en general son capaces de ocupar distintos nichos y adaptarse a todo tipo de condiciones ambientales. Esto es debido tanto a su gran versatilidad metabólica, que les permite utilizar distintos compuestos como fuente de carbono y energía, como a la producción de metabolitos secundarios que limitan el crecimiento de microorganismos competidores. En conjunto, las pseudomonas son capaces de colonizar toda la superficie de la planta (Espinosa-Urgel, 2004) y en concreto, las cepas pertenecientes a la especie *P. fluorescens* están adaptadas a sobrevivir en el suelo y colonizar su rizosfera (Kiely y col., 2006), siendo algunas de ellas buenos candidatos como agentes de biocontrol (Couillerot y col., 2009).

La cepa *P. fluorescens* F113 es capaz de producir metabolitos con actividad antibiótica y antifúngica como el ácido cianhídrico (HCN), o el DAPG (Shanahan y col., 1992); así como de sintetizar estructuras y compuestos que revierten finalmente en mejoras para la planta como: (i) sistemas de secreción tipo III (TTSS, del inglés *Type three secretion system*), (ii) pioverdina, un quelante para la captación de Fe^{3+} del medio; y (iii) ACC deaminasa, enzima que degrada el precursor del etileno ACC, (Moënne-Loccoz y col., 2001; Couillerot y col., 2009). Se ha observado que la síntesis de DAPG, antifúngico de amplio espectro, producto del metabolismo secundario de la bacteria, es eficaz frente a la enfermedad del *black-root-rot* del tabaco (*Nicotina tabacum*), producido por el hongo *Thielaviopsis basicola* (Keel y col., 1990) y del *damping off*, causada por *Pythium ultimum* en la remolacha (Fenton y col., 1992). Además de ser una de las cepas que mejor coloniza competentemente la rizosfera (Lugtenberg y Bloemberg, 2004), ya se ha demostrado su capacidad como agente de

biocontrol contra varios tipos de hongos en distintos sistemas planta-patógeno (Barahona y col., 2011).

Esta cepa ha sido modificada genéticamente con el objeto de ser utilizada en la biorremediación de bifenilos policlorados, contaminantes de suelos (Villacieros y col., 2003; Villacieros y col., 2005), y ya se han realizado algunos estudios sobre el posible impacto ambiental que pudiera ocasionar en las comunidades microbianas autóctonas del suelo y la rizosfera (de Cárcer y col., 2007a; de Cárcer y col., 2007b).

Las posibles mejoras en la colonización del sistema radicular por parte de esta bacteria, podrían promover los mecanismos de biocontrol y biorremediación que son llevados a cabo por esta cepa, ya que se ha demostrado que una inadecuada colonización afecta a las capacidades de biocontrol (Schippers y col., 1987), así como que existe una relación inversa entre el número de bacterias con capacidad de biocontrol, presentes en la raíz y el número de lesiones observadas en la planta (Bull y col., 1991).

3. Factores importantes para la colonización de la rizosfera

Ya se ha comentado que el número de bacterias encontradas en suelo rizosférico es entre uno y dos órdenes de magnitud superior al de suelo no rizosférico, sin embargo, la diversidad microbiana en esta zona es considerablemente menor, indicando que existe una presión selectiva por parte de la rizosfera. Análisis de expresión llevados a cabo con la cepa *P. putida* durante la colonización de la rizosfera de plantas de maíz (*Zea mays*) han conseguido identificar distintos genes que se inducen específicamente durante este proceso (Matilla y col., 2007a; Matilla y col., 2011).

Los principales factores y genes en la colonización del ápice radicular parecen ser la movilidad, la adhesión a la raíz, una mayor tasa de crecimiento frente a los exudados de la raíz, la síntesis de aminoácidos, la presencia de cadena O-antigénica lateral de lipopolisacárido, el sistema de dos componentes ColR/ColS, las recombinasas específicas de sitio Sss y XerD, el operón *nuo*, el gen *secB*, implicado en la ruta Sec de secreción de proteínas, y el TTSS (Simons y col., 1997; Lugtenberg y Dekkers, 1999; Lugtenberg y col., 2001; Martínez-Granero y col., 2005; Matilla y col., 2007b; Lugtenberg y Kamilova, 2009). Además, la rizosfera contiene una alta proporción de bacterias productoras de N-Acil Homoserina Lactonas (AHL), principales moléculas

señal del *quorum sensing* en bacterias gram negativas, comparadas con el suelo no rizosférico, hecho que sugiere un papel del QS en la colonización (Elarsi y col., 2001).

En el artículo publicado por Lugtenberg y colaboradores (2001), se describen algunos métodos para mejorar la capacidad de colonización por parte de las rizobacterias: (i) la introducción de múltiples copias del gen *sss* de la cepa *P. fluorescens* WCS365 en la cepa *P. fluorescens* WCS307, provoca un aumento en su capacidad de colonización del ápice radicular de plantas de tomate, lo que demuestra que es posible mejorar la capacidad de colonización de una cepa mediante técnicas de ingeniería genética (Dekkers y col., 2000). Este hecho podría explicarse en base a que la introducción de varias copias de *sss* produciría en estas cepas un equilibrio entre los variantes de fase, de los que hablaremos más adelante (apartado 3.2), provocando un aumento de células competentes para la colonización (Dekkers y col., 2000). (ii) Aislar colonizadores mejorados por enriquecimiento de un determinado compuesto, como se ha hecho en el caso del naftaleno. La aplicación de esta técnica permite encontrar colonizadores con efectos biopesticida, biofertilizante o fitoestimulante más eficientes (Kuiper y col., 2001). Y (iii) aislando mejores competidores en ensayos de colonización competitiva (Kamilova y col., 2005).

3.1. Movilidad, quimiotaxis y adherencia

Numerosos estudios han confirmado que la movilidad es un factor importante para una mejor capacidad de competición de la rizosfera, tanto para microorganismos patógenos como beneficiosos (Dutta y Podile, 2010), ya que la bacteria podría dirigirse hacia ambientes favorables, y escapar de condiciones adversas, incluso para colonizar competitivamente los ambientes de interés de manera más exitosa que otros organismos (Fenchel, 2002). Además, se sabe que las flagelinas bacterianas juegan un importante papel en el reconocimiento entre bacterias beneficiosas y plantas hospedadoras (Che y col., 2000; Parker, 2003; Shimizu y col., 2003).

Para que se establezca la interacción planta-microorganismo, es necesario que el microorganismo, de vida libre, se dirija activamente hacia la raíz de la planta, en un movimiento mediado por quimiotaxis, que ha sido demostrado tanto *in vitro* como en microcosmos de suelo (Bashan, 1986; Espinosa-Urgel y col., 2002). Se define quimiotaxis como el mecanismo por el que las bacterias son capaces de responder eficiente y rápidamente a cambios en la composición físico-química de su ambiente,

dirigiéndose hacia ambientes favorables, y escapando de los desfavorables (Bren y Eisenbach, 2000).

La señal para la activación del complejo receptor, localizado en un extremo de la célula, es la detección del compuesto químico (atrayente o repelente), y es transmitida hasta un segundo complejo, el motor del flagelo, donde tiene lugar la respuesta al estímulo. El complejo receptor está formado por una serie de proteínas transmembrana (MCPs, del inglés *methyl-accepting chemotaxis proteins*), un adaptador (CheW), que conecta estas MCPs con la histidín quinasa de un sistema de dos componentes (CheA/CheY), cuyo regulador de respuesta (CheY), es capaz de trasladarse por el interior celular hasta el flagelo y provocar cambios conformacionales en este, que darán lugar a un cambio en la rotación del motor (Figura 1).

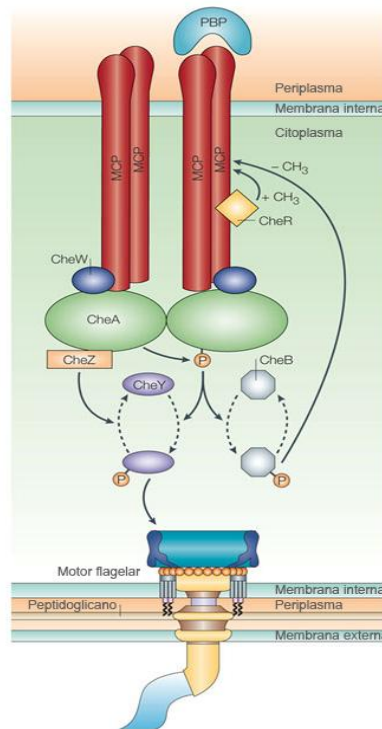


Figura 1: Esquema de las interacciones que se producen durante la transducción de señales quimiotácticas bacterianas. El adaptador CheW conectaría las proteínas MCPs de membrana con la quinasa CheA, que al activarse fosforilaría a la proteína CheY, responsable de la interacción con el complejo de rotación del flagelo (modificado de Wadhams y Armitage, 2004).

Tras la activación de CheA, esta proteína fosforila a la proteína CheY. La fosforilación de CheY (CheY-P) disminuye su afinidad por CheA, mientras que la aumenta por FlhM, uno de los componentes del motor del flagelo (ver apartado 3.1.1.1) (Schuster y col., 1993; Welch y col., 1993; Li y col., 1995; McEvoy y col., 1999). La interacción

CheY-P–FlhM aumenta las posibilidades de que el flagelo rote en sentido CW (a favor de las agujas del reloj, del inglés *clockwise*) (Barak y Eisenbach, 1992).

En enterobacterias se ha descrito un único sistema de quimiotaxis compuesto por las seis proteínas Che principales (CheA, CheB, CheR, CheW, CheY, CheZ) y las MCPs. Pero además, en diversas especies bacterianas, se ha descrito la existencia de otra proteína presente en estos complejos receptores, la proteína CheV, que parece actuar como una proteína adaptadora alternativa que, al igual que CheW, conecta las proteínas receptoras MCPs con CheA (Fredrick y Helmann, 1994). En las especies del género *Pseudomonas* existen más de 20 genes *che* (Stover y col., 2000), que se encuentran agrupados en el genoma en 5 *clusters*: *cluster* con genes *che*: *cluster* I, *cluster* II y *cluster* V, y además los *cluster* III, formado por el sistema Wsp, y *cluster* IV, formado por los genes *pilGHIJK* y *chpABCDE* (Ferrández y col., 2002, Kato y col., 2008). Los *clusters* I, II y V están implicados en la quimiotaxis mediada por flagelos (Masduki y col., 1995; Kato y col., 1999; Ferrández y col., 2002; Güvener y col., 2006), mientras que los *cluster* III y IV regulan la expresión de exopolisacáridos Pel y Psl (Hickman y col., 2005) y la movilidad tipo *twitching* (Darzins, 1994; Whitchurch y col., 2004), respectivamente. Mutaciones en los genes *che* de *P. aeruginosa* afectan a la frecuencia de cambio de sentido de rotación del flagelo del mismo modo en que ocurre en enterobacterias (Schmidt y col., 2011).

Además, en cuanto a su papel en colonización, se ha descrito que mutantes en el gen *cheA* en distintas cepas de *P. fluorescens* están claramente afectados en colonización competitiva en el ápice de raíces de tomate (Shanahan y col., 1992; de Mot y Vanderleyden, 1994; Rainey, 1999; Dekkers y col., 2000), indicando que existe un proceso de quimiotaxis durante la colonización de la raíz, aunque cuando estos mutantes *cheA* se ensayaban en solitario, no en competición, su capacidad de colonización no era significativamente menor (De Weert y col., 2002).

La movilidad, la adhesión y la formación de biopelículas son procesos influenciados claramente por quimiotaxis, de manera que bacterias de vida libre tienen la capacidad de colonizar nuevos espacios y establecerse en forma de biopelículas, y a su vez, estas bacterias que forman parte de la biopelícula pueden disgregarse de ella y volver a una forma de vida libre en busca de ambientes más favorables. (Schmidt y col., 2011)

Algunas de las especies del género *Pseudomonas* pueden sintetizar más de nueve flagelos polares por célula (de Weger y col., 1987; Lugtenberg y col., 2001). Saber si

verdaderamente el flagelo jugaba o no un papel importante en la colonización ha sido discutido desde los años 80. Las primeras publicaciones indicaban que mutantes inmóviles de distintas especies de pseudomonas no estaban afectados en colonización de raíces de trigo (*Triticum aestivum*) y soja (*Glycine max*) (Howie y col., 1987; Scher y col., 1988). Sin embargo, estudios llevados a cabo con mutantes inmóviles de *P. fluorescens* WCS374 (de Weger y col., 1987), *P. fluorescens* WCS365 y *P. putida* WCS358 (Simons y col., 1996) estaban claramente afectados en colonización competitiva en el ápice de raíces de trigo, tomate, rábano (*Raphanus sativum*) y patata (*Solanum tuberosum*). Otros estudios realizados usando diferentes cepas parentales de pseudomonas, sistemas de suelo y planta, encontraron que los mutantes inmóviles o con movilidad reducida pertenecen al grupo de mutantes en colonización competitiva más afectados (Dekkers y col., 1998a, Chin-A-Woeng y col., 2000; Capdevila y col., 2004). Estos estudios indican en conjunto que la movilidad dependiente de flagelos mediada por quimiotaxis, es una de las estrategias más importantes para llegar hasta la rizosfera, por parte de muchas de las especies de *Pseudomonas* que ejercen efectos beneficiosos sobre las plantas.

3.1.1. El flagelo

Con la aparición de los primeros microscopios, se observó que las bacterias eran organismos móviles. En la actualidad, 330 años más tarde, sabemos que el orgánulo principal que utilizan los organismos procariotas para moverse es el flagelo. Mediante sistemas de detección quimiotácticos y el movimiento tipo *swimming* dependiente de flagelos, las bacterias adquirieron la capacidad de alejarse activamente de los ambientes desfavorables, y elegir otras condiciones beneficiosas para sobrevivir (Armitage, 1999; Thormann y Paulick, 2010).

Los flagelos son apéndices más o menos largos y finos, de unos 20 nm de diámetro que se encuentran anclados a la célula por uno de sus extremos. Su disposición varía según la especie bacteriana y puede clasificarse en polar, o lateral, aunque ambos presentan la misma estructura. Gracias al movimiento de los flagelos, las bacterias son capaces de moverse de manera activa en medios líquidos, viscosos o semi-sólidos mediante dos tipos de movimientos natatorios conocidos como *swimming* y *swarming*. El *swimming* es un tipo de movimiento dependiente de quimiotaxis, en el que las células se desplazan de manera individual, formando halos concéntricos en medios

semi-sólidos. En medios líquidos, estos movimientos se observan en forma de carreras lineales que se interrumpen por cambios direccionales bruscos debidos a modificaciones en el sentido de rotación del filamento flagelar: en direcciones CW y CCW (del inglés *counter clockwise*). Por otro lado, el *swarming* es un movimiento multicelular coordinado de las bacterias sobre superficies semi-sólidas, en el que las células sufren un proceso de diferenciación morfológica, convirtiéndose en células especializadas, hiperflageladas, y generalmente más alargadas (Harshey, 1994; 2003). Es un movimiento dependiente de surfactantes como ramnolípidos, y se visualiza en forma de dendritas bacterianas sobre la superficie sobre la que se están moviendo. En enterobacterias el movimiento tipo *swimming* es llevado a cabo por los flagelos polares, mientras que los flagelos laterales permiten el movimiento tipo *swarming*. Por su parte, las pseudomonas sólo producen flagelos polares que son responsables de los dos tipos de movimientos.

Además de en la movilidad, donde tiene un papel principal, el flagelo también participa en otros procesos como la adhesión a sustrato y formación de biopelículas, o interacciones con otros organismos (Pratt y Kolter, 1998; Young y col., 1999).

3.3.1.1. Estructura del flagelo

El flagelo bacteriano es un gran complejo macromolecular formado por más de 30 proteínas diferentes con miles de copias de algunos de sus componentes (Macnab, 2003; Minamino y Namba, 2004). A pesar de que existen algunas diferencias, las características generales son comunes para todos los sistemas flagelares, aunque el sistema mejor estudiado es el de enterobacterias.

Estructuralmente, el flagelo se divide en tres partes: el cuerpo basal, el gancho y el filamento. El cuerpo basal se encuentra embebido en la envuelta celular y se encarga de la rotación del filamento en dos sentidos: a favor y en contra de las agujas del reloj (CW o CCW, respectivamente), actuando como un motor de rotación reversible. Por su parte, tanto el gancho, que une el cuerpo basal con el filamento, como el filamento en sí, que funciona como una hélice para la propulsión de la célula, se extienden hacia el exterior (Macnab, 2003; Minamino y Namba, 2004).

El cuerpo basal está formado por un soporte estructural, el aparato de exportación flagelar y un verdadero motor para el movimiento del flagelo, que es capaz de rotar

gracias a la energía generada por el paso de iones a través de la membrana citoplasmática interna hacia el interior celular (Berg, 2003). Este motor consiste en un rotor, un eje y alrededor de una docena de unidades estáticas, el estator. El rotor está compuesto por una serie de anillos y un eje (Aizawa y col., 1985; Francis y col., 1994; Thomas y col., 1999) que se localizan en distintas posiciones entre las dos membranas celulares (Figura 2): (i) El anillo L (Lipopolisacárido), en la membrana externa, (ii) el anillo P (Peptidoglicano) (PG), (iii) el anillo MS, localizado en la membrana interna y (iv) el anillo C, en la cara citoplasmática del anillo MS. El eje del rotor, se encuentra fuertemente asociado con el anillo MS, de manera que la transmisión de la fuerza de torsión sea lo más eficiente posible (Saijo-Hamano y col., 2004).

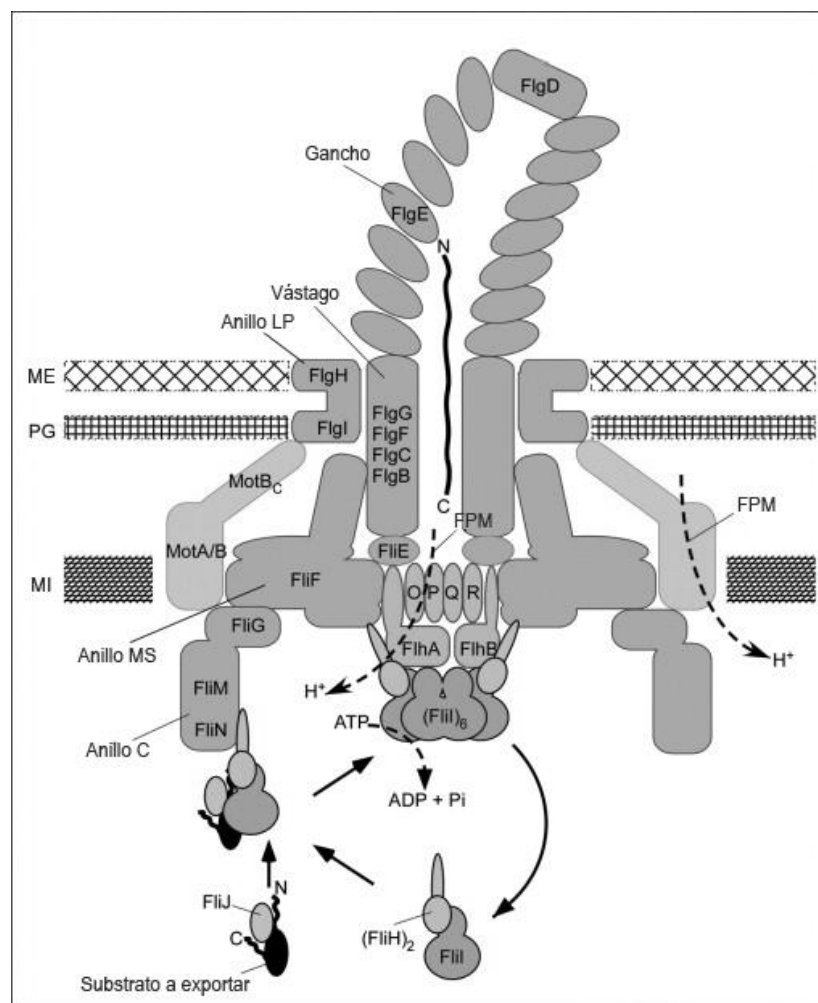


Figura 2: Esquema de los componentes del cuerpo basal y el gancho del flagelo. El cuerpo basal está formado por el anillo MS (FliF), el anillo C (FliG, FliM y FliN), el eje o vástago (FliE, FlgB, FlgC, FlgF y FlgG), los anillos P y L (FlgI y FlgH) y el aparato de exportación flagelar (FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ, FliR; y FliI, FliH, FliJ, como componentes citoplásmicos). Además está compuesto por varios complejos MotA/MotB que generan la fuerza de torsión para la rotación del motor. El gancho está constituido por la proteína FlgE y la proteína final, FlgD (Minamino y col., 2008).

El anillo MS (Figura 2) se autoensambla en la membrana citoplasmática interna (Jones y col., 1990; Ueno y col., 1992), mientras que el anillo C, formado por las proteínas FliG, FliM y FliN, se ancla en la cara interna del anillo MS. Estas tres proteínas son responsables tanto de la generación del par de torsión, por interacción con las proteínas del estator, como del cambio de dirección en la rotación del flagelo, permitiendo al motor girar en sentido CW o CCW (Yamaguchi y col., 1986). Además, FliM y FliN forman un complejo estable (Brown y col., 2005) encargado de detectar las señales transmitidas a través de los sistemas de quimiotaxis. La unión de la proteína quimiotáctica fosforilada CheY-P al complejo FliMN, parece inducir un cambio en la conformación de FliG que provoca reordenamientos entre el rotor y el estator, permitiendo que el motor gire en sentido CW (Dyer y col., 2009; Sarkar y col., 2010).

El estator está formado por canales para el paso de iones a través la membrana, y es el responsable de la generación de la energía mecánica para la rotación del motor del flagelo (Berg, 2003). Se han descrito dos tipos de estator: compuestos por complejos MotA y MotB, con canales dependientes de H^+ , como en *E. coli*; o PomA y PomB, en canales dependientes de Na^+ , como en *Vibrio* (Sato y Homma, 2000; Braun y col., 2004; Kojima y Blair, 2004; Terashima y col., 2008), siendo la subunidad A la responsable de la interacción con la proteína FliG del anillo C (Zhou y col., 1998; Yorimitsu y col., 2003).

Además, muchas de las subunidades que conforman el flagelo, corresponden a proteínas externas que han de ser exportadas desde el interior celular, donde son sintetizadas, hasta el exterior. A excepción de las proteínas que forman los anillos P y L, que son secretadas a través de la vía Sec, todas las demás atraviesan la membrana plasmática utilizando el aparato de exportación flagelar, que reconoce, despliega y transloca estos componentes al interior del canal central, y desde ahí hacia la parte distal, provocando la elongación de la parte final del flagelo (Macnab, 2003; Minamino y Namba, 2004; Minamino y col., 2008).

El gancho es la zona curvada que conecta el cuerpo basal con el filamento y permite convertir el movimiento rotatorio, generado en el motor, en helicoidal para impulsar a la célula. Cuando el gancho alcanza la longitud adecuada, se produce un cambio conformacional del aparato de exportación, que tiene como consecuencia la exportación de las proteínas tardías: la síntesis del filamento (Aldridge y col., 2006; Chevance y Hughes, 2008; Anderson y col., 2010).

El filamento es una estructura helicoidal de unos 20 nm de diámetro y longitud variable, compuesta de 11 protofilamentos, que consiste en miles de copias (entre 20.000 y 30.000 copias) de una única proteína, la flagelina (Samatey y col., 2001; Bardy y col., 2003). En el extremo más distal del flagelo se encuentra lo que se ha denominado la proteína final o *capping-protein*, que está constituida por cinco monómeros de la proteína FliD. El filamento va elongándose mediante el ensamblaje de monómeros de FliC a la parte más distal del flagelo, justo delante de FliD (Yonekura y col., 2000).

3.1.1.1.Regulación de la movilidad a nivel de la biosíntesis del flagelo.

La biosíntesis del flagelo es un proceso energéticamente muy costoso para la célula, ya que en torno a un 2% de la energía obtenida por *E. coli* se utiliza sólo en su biosíntesis (McCarter, 2001; Macnab, 2003), y más de 40 genes participan en su regulación.

A nivel genético, el proceso de biosíntesis del flagelo mejor conocido es el de enterobacterias (Macnab, 1996), aunque también se han realizado estudios detallados en otras especies como *Caulobacter crescentus* (Wu y Newton, 1997), *Vibrio cholerae* (Prouty y col., 2001) o *Vibrio parahaemolyticus* (Kim y McCarter, 2000; McCarter, 2001).

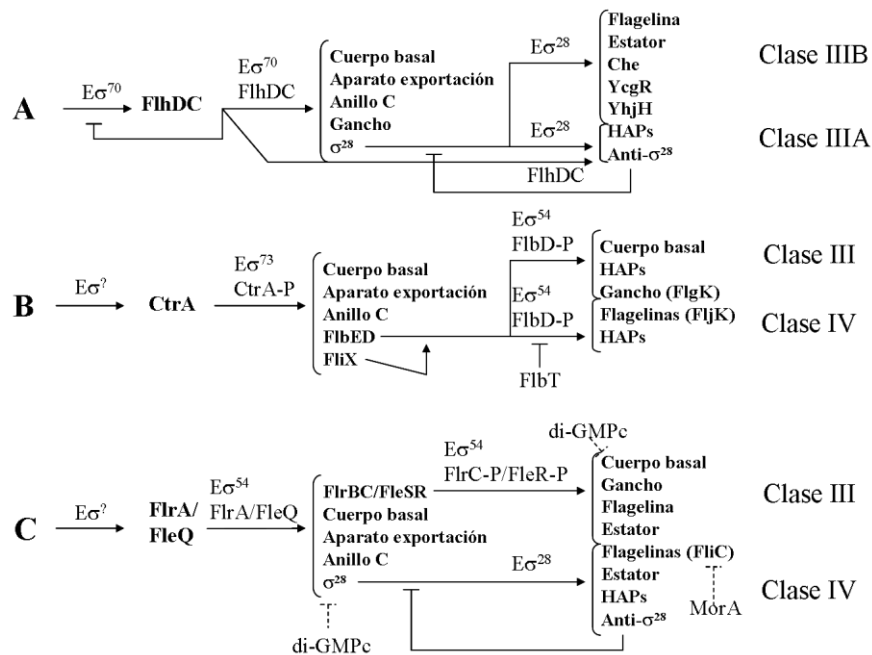


Figura 3: Esquema de la transcripción jerarquizada de los componentes del flagelo en distintas especies. **A:** Enterobacterias, **B:** *Caulobacter* y **C:** Vibrios y Pseudomonas. Las flechas indican inducción génica, y las barras, inhibición. Anti-σ²⁸ = FlgM; -P = sustrato fosforilado (modificado de Wolfe y Visik, 2008).

En todos los casos existe una relación entre la producción de los componentes estructurales y su ensamblaje, que en conjunto resulta en un proceso extremadamente ordenado en cuanto a la síntesis, incorporación, exportación y ensamblaje de estos componentes (McCarter, 2006). Por ello, aunque existen diferencias en la regulación, en todos los casos, los promotores de los genes que participan en el proceso pueden clasificarse en tres o cuatro niveles distintos, en función del momento de su expresión (Figura 3). Así se agrupan en promotores de clase I, clase II, clase III y en su caso, clase IV (*C. crescentus* y distintas especies de *Vibrio* y *Pseudomonas*).

En cepas del género *Pseudomonas*, el caso mejor estudiado es el de *P. aeruginosa*, cuyos genes flagelares se encuentran localizados en tres regiones no contiguas a lo largo del cromosoma bacteriano, y se clasifican en cuatro grupos de genes (Dasgupta y col., 2003). La biosíntesis del flagelo en esta especie está controlada por un regulador principal, FleQ (Arora y col., 1997), por el sistema FleSR (Ritchings y col., 1995), tres factores sigma: σ^{70} , σ^{54} (o RpoN) y σ^{28} (o FliA) (Totten y col., 1990; Starnbach y Lory, 1992; Dasgupta y col., 2002) y el factor anti-sigma FlgM (anti- σ^{28}), que regula la funcionalidad de FliA y a su vez de la flagelina (Frisk y col., 2002). Además, cada cepa es capaz de expresar un tipo u otro de flagelo, en función de si sintetiza flagelina tipo a, sintetizado por la cepa *P. aeruginosa* PAK, o tipo b, por PAO1 (Spangenberg y col., 1996). La principal diferencia entre estos dos tipos de flagelina se encuentra en la ausencia de una larga secuencia de aminoácidos en la región central de la flagelina tipo a, lo que provoca una diferencia en su masa molecular (Rotering y Dorner, 1989; Brimer y Montie, 1998). Cada uno de estos tipos de flagelina se ensambla con su correspondiente proteína final del filamento, FliD tipo A o tipo B, lo que hace pensar que estos genes se han transferido en bloque mediante transferencia horizontal, ya que además no son intercambiables (Arora y col., 2000). Al estar implicadas varias proteínas, se habla también de flagelos tipo a y tipo b. *P. aeruginosa* presenta un único flagelo en posición polar, cuya biosíntesis está regulada en cuatro niveles:

(i) Genes de clase I: FleQ es el regulador principal de la síntesis del flagelo en *pseudomonas*, y regula directa o indirectamente la expresión de la mayoría de los promotores de los genes flagelares, a excepción del factor σ^{28} (FliA). Por ello se considera a *fleQ* y *fliA* genes de clase I, cuyos promotores están regulados por factores externos. En *pseudomonas*, la transcripción de *fleQ* requiere del factor σ^{70} (activador) y, es reprimida por Vfr y AmrZ entre otros (Dasgupta y col., 2002; Tart y col., 2006).

Además su expresión parece estar de alguna manera influenciada por interrupciones en la biosíntesis del propio flagelo (Dasgupta y col., 2002). Por otra parte, no se conoce cómo se regula la expresión de *fliA*, ya que parece ser independiente de todos los factores σ estudiados (Dasgupta y col., 2003).

(ii) Genes de clase II: Los genes que se engloban en este grupo dependen de FleQ y del factor σ^{54} (RpoN) para su transcripción. Codifican componentes estructurales del cuerpo basal y la proteína final del filamento (Figura 4). En concreto, del anillo MS (*fliF*), del anillo P (*flgA*, chaperona responsable del ensamblaje del anillo P), del anillo C (*fliGMN*), parte del eje (*fliE*), del aparato de exportación flagelar (*flhAB*, *fliOPQR* y *fliHIJ*), y genes que codifican proteínas con funciones relacionadas con la elongación del filamento (*fliD*, la proteína final del filamento, y *fliS*, chaperona de FliC). Además se sabe que se transcriben en este momento algunos genes cuya función aún está por identificar como: (a) *fliL*, de función desconocida, aunque se ha descrito como una proteína integral de membrana que forma parte del cuerpo basal del flagelo en *Salmonella* (Schoenhals y Macnab, 1999). Su mutación provoca fenotipos muy variados en distintas especies bacterianas, aunque parece que su función estaría relacionada con la rotación del flagelo y el mantenimiento de su estabilidad, a nivel del eje, durante el movimiento tipo *swarming* (Jenal y col., 1994; Raha y col., 1994; Attmannspacher y col., 2008; Belas y col., 2009; Suaste-Olmos y col., 2010). (b) *fliS'* de función desconocida, que en las cepas que presentan flagelos tipo a se transcribe junto con *fliD* y *fliS*, y (c) *fleP*, solo descrita en *Pseudomonas* y parece estar implicada en la estabilidad del flagelo maduro (Dasgupta y col., 2003).

Entre las proteínas reguladoras de clase II se encuentran FlhF, FleN, FleS y FleR. FlhF y FleN se transcriben en un único ARN mensajero (ARNm) bicistrónico. Por un lado, FlhF es responsable de la localización del flagelo en posición polar en varias especies de *Pseudomonas* como *P. putida* (Pandza y col., 2000), y *P. aeruginosa* (Murray y Kazmierczak, 2006). Por otro, FleN reprime la actividad de FleQ por unión directa, y parece jugar un papel muy importante en la regulación del número de flagelos por célula (Dasgupta y col., 2000; Dasgupta y Ramphal, 2001). FleS y FleR forman un sistema de dos componentes, siendo FleS la quinasa y FleR el regulador de respuesta (Ritchings y col., 1995). Se cree que la fosforilación de FleR es necesaria para el paso de la transcripción de los genes de clase II a los de clase III.

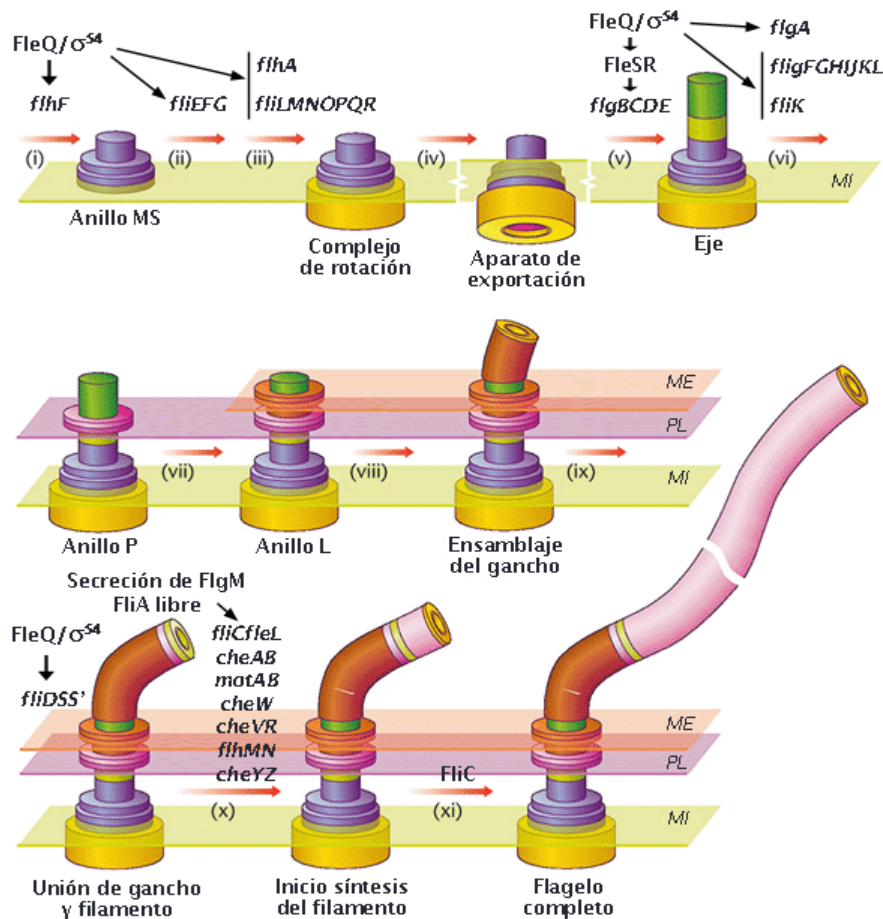


Figura 4: Modelo del ensamblaje del flagelo y los genes que se activan en cada paso en *P. aeruginosa*. El ensamblaje del flagelo comienza con la formación del anillo MS en la membrana interna, que sirve de anclaje para el anillo C. A continuación el aparato de exportación flagelar tipo III se ensambla dentro del poro central del anillo MS, que transloca los componentes estructurales del eje, cuyo ensamblaje está mediado por la proteína FlgJ, proteína final o *capping-protein* del eje. Una vez formado el eje se ensamblan los anillos P y L, y las subunidades que conforman el gancho, cuya correcta formación depende también de una *capping-protein*, FlgD, la proteína final del gancho. Cuando el gancho alcanza la longitud adecuada, se exporta el factor anti-sigma FlgM y se ensamblan las proteínas de unión entre filamento y gancho, y la proteína final del filamento (FliD). Por último se produce la exportación y ensamblaje de las subunidades del filamento, la flagelina (FliC) (modificado de Aizawa, 1996).

(iii) Genes de clase III: Todos ellos requieren la expresión de FleQ, RpoN y FleSR, aunque parece que la implicación de FleQ es indirecta. Codifican proteínas estructurales del cuerpo basal y del gancho (Figura 4), en concreto: (a) estructurales del eje (*flgBC*, *flgFG*) y para su ensamblaje, *flgJ* (Hirano y col., 2001); (b) del anillo LP (*flgHI*); (c) *fliK*, que controla desde el cuerpo basal la longitud del gancho; y (d) del gancho (*flgDE*, siendo FlgE la proteína estructural y FlgD la *capping-protein* o proteína final del gancho) y proteínas de unión entre el gancho y el filamento (*flgKL*).

(iv) Genes de clase IV: Para su transcripción necesitan la presencia de todos los anteriores (FleQ, RpoN y FleSR), y del factor σ^{28} , FliA. Sin embargo, uno de los

promotores, el responsable de la transcripción de *flgMN*, mantiene cierta actividad basal en ausencia de cualquiera de los genes anteriores (Frisk y col., 2002; Dasgupta y col., 2003). Estos niveles basales de la proteína FlgM, se unen a la proteína FliA libre, inhibiendo inicialmente su actividad. Tras la expresión de los genes de clase II y III, y el completo ensamblaje del cuerpo basal y el gancho, FlgM sería secretada mediante un mecanismo similar al descrito para *S. enterica* sv typhimurium (Karlinsky y col., 2000), liberando a FliA y permitiendo así la expresión de los genes de clase IV (Figura 4). Estos genes codifican proteínas estructurales del filamento (*fliC* y *fleL*, que codifican la flagelina y una proteína responsable de la longitud del filamento respectivamente), del motor flagelar (*motAB*) y de los sistemas de quimiotaxis (*cheAB*, *cheW* y *cheVR*), además de las proteínas reguladoras FlgM (el factor anti- σ^{28}) y FlgN (responsable del inicio del ensamblaje del filamento).

Sin embargo, la regulación de la biosíntesis del flagelo en otras especies de *Pseudomonas* presenta ciertas diferencias con el modelo presentado para *P. aeruginosa*. En las especies de *P. putida* y *P. syringae* se observa que los genes correspondientes a la región III de *P. aeruginosa* se localizan en el mismo orden pero corriente arriba del gen *flhB*, en la misma región en *P. putida*, y a unas 6 Kb en *P. syringae*. Además, en *P. putida* existe una zona de 8,8 Kb que separa los genes *flhB* y *flhA* (Dasgupta y col., 2004). En lo que a la cepa *P. fluorescens* F113 se refiere, que codifica como *P. aeruginosa* PAO1 flagelos de tipo b, se ha estudiado la organización y regulación de una región genética de 6,5 Kb, localizada entre los genes *fliC* y *fleQ* (Capdevila y col., 2004; Redondo-Nieto y col., 2008). La organización genética de esta región es idéntica a la que aparece en otras pseudomonas con flagelos tipo b como *P. fluorescens* Pf0-1, *P. aeruginosa* PAO1, *P. putida* KT2440 o *P. syringae* (Nelson y col., 2002). Sin embargo, en cuanto a su regulación, se ha observado que la expresión de *flaG* (*fleL* en *P. aeruginosa*) y el operón formado por los genes *fliST* (*fliSfleP* en *P. aeruginosa*) no dependen la de expresión de FleQ, ni de cualquier otro factor sigma alternativo, indicando que se encuentran en el mismo nivel, en cuanto a jerarquía, que el gen *fleQ*. Además, al contrario que en esa cepa, la expresión de *flaG* es completamente independiente a la de *fliC* (Figura 5), de lo que se deduce que la biosíntesis del flagelo no se encuentra regulada de la misma manera en todas las cepas de *Pseudomonas*, incluso aunque codifiquen el mismo tipo de flagelos (Redondo-Nieto y col., 2008).

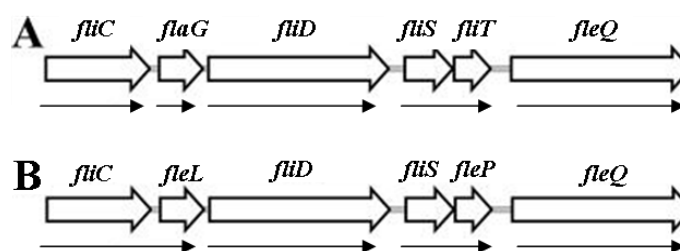


Figura 5: Esquema de la organización genética de la región localizada entre los genes *fliC* y *fleQ* en dos cepas de *Pseudomonas* que codifican flagelos tipo b: *P. fluorescens* F113 (A) y *P. aeruginosa* PAO1 (B). Las flechas situadas debajo de los genes indican si se transcriben de manera mono o bicistrónica.

En resumen, la biosíntesis del flagelo en *Pseudomonas* o en cualquier otra especie bacteriana, está controlado por un gran número de reguladores, requiere la expresión de un alto número de genes, y múltiples copias de muchos de ellos. Como evidencia la gran cantidad de reguladores que controlan la expresión génica de los genes flagelares, la célula ha de integrar múltiples señales antes de comenzar o no la síntesis de un nuevo flagelo. En según qué circunstancias y teniendo en cuenta el coste energético, puede ser ventajoso que la célula pueda moverse, o no. (McCarter, 2006).

3.1.1.2. Regulación de la movilidad tras el ensamblaje del flagelo: el di-GMPc

En enterobacterias, el motor del flagelo gira en sentido CCW en condiciones normales. En esta situación, los múltiples flagelos bacterianos forman un penacho, agrupándose en uno de los polos de la célula, girando e impulsando en conjunto el avance de la bacteria en una dirección concreta. Cuando las proteínas de los sistemas de quimiotaxis se unen al complejo FliMN, se inducen cambios en la conformación de estas proteínas que son transmitidos a FliG, que interacciona directamente con MotA en la generación del par de torsión (Berg, 2003; Sowa y col., 2005). Esto provoca una tendencia a que el motor cambie de sentido de rotación y pase a rotar en sentido CW. Cuando esto ocurre, el penacho se dispersa, la generación de la fuerza del par de torsión se desregula y la célula se mueve al azar, dando “tumbos” (en un movimiento denominado *tumbling*) hasta detectar concentraciones crecientes de un nuevo quimioatrayente. En este momento, la bacteria vuelve a nadar en una única dirección, con el flagelo rotando de nuevo en sentido CCW.

Diversos estudios recientes publican la existencia de una regulación de la movilidad cuando el flagelo se encuentra completamente ensamblado (Girgis y col., 2007;

Boehm y col., 2010; Fang y Gomersky 2010; Paul y col., 2010). Esta regulación parece estar mediada por un segundo mensajero muy importante en bacterias: el nucleótido bis-(2'-5')-guanosín monofosfato dimérico cíclico (di-GMPc), cuyos niveles determinarán el estilo de vida de la bacteria, móvil o sésil. Se ha descrito que los dominios tipo PilZ son capaces de unir di-GMPc e interactuar con el motor del flagelo, afectando tanto a la velocidad, como a la tasa de cambio de sentido de rotación (Amikam y Galperin; 2006; Römling y Amikam, 2006; Ryjenkov y col., 2006; Christen y col., 2007), regulando por tanto los dos tipos de movilidad mediada por flagelos: *swimming* y *swarming* (Ko y Park, 2000; Ryjenkov y col., 2006). Las distintas concentraciones de di-GMPc se traducen en cambios en la velocidad de movimiento tipo *swimming*, de manera que existe una correlación inversa entre la velocidad de *swimming* y las concentraciones celulares de di-GMPc (Boehm y col., 2010). En enterobacterias, esta información es transmitida a través de la unión del segundo mensajero al dominio PilZ de la proteína YcgR, de manera que di-GMPc-YcgR interactúa con el complejo de cambio de sentido de rotación del flagelo y del estator, en concreto con las proteínas FliG, FliM (Paul y col., 2010) y MotA (Boehm y col., 2010). De este modo, YcgR podría actuar como un freno en dos sentidos: disminuyendo la velocidad del motor e inhibiendo preferencialmente su rotación en dirección CCW. Este tipo de regulación de la movilidad, mediante el control de la velocidad del flagelo ensamblado, presenta algunas ventajas sobre la regulación transcripcional de los genes flagelares ya que el control sobre el motor es más rápido, y también más rápidamente reversible que los mecanismos basados en la expresión génica o en el ensamblaje.

Además, el control de la velocidad en la movilidad tipo *swimming* es dependiente de la fase de crecimiento. Durante la entrada en fase estacionaria, el complejo di-GMPc-YcgR provoca una reducción significativa de la velocidad. Este comportamiento puede resultar crítico para su supervivencia, reservando su energía para convertirse en células en reposo bajo condiciones desfavorables (Boehm y col., 2010). Además, la inhibición del *tumbling* junto con la reducción en la fuerza de torsión del motor, podría proporcionar a las células una gran oportunidad de interactuar con el sustrato, favoreciendo las primeras etapas de la formación de biopelículas. *P. aeruginosa* también ajusta su movilidad durante la transición de vida móvil a sésil, pero usando otra estrategia. En esta especie se ha documentado que la acumulación de di-GMPc

favorece la formación de biopelículas por aumento de la síntesis de EPS, mientras se inhibe simultáneamente la metilación de quimiorreceptores para disminuir la frecuencia de cambio de sentido del flagelo a través de los sistemas de quimiotaxis (Caiazza y col., 2007; Kuchma y col., 2007). La inhibición de la movilidad y de la quimiotaxis podría representar una estrategia para preparar a la célula para un estilo de vida sésil impidiendo la migración de un sustrato en que se formará una biopelícula (Paul y col., 2010).

En relación con la colonización, estudios realizados *in vitro* con la cepa *Azospirillum brasilense* proponen que el mecanismo de adhesión de la bacteria a la raíz de la planta se desarrolla en dos etapas: la primera se denomina fase de adsorción, depende de los flagelos polares y consiste en una unión rápida y débil de la bacteria a la superficie de la raíz. A continuación tendría lugar la etapa de anclaje, donde intervienen polisacáridos bacterianos, responsables de la adhesión de la bacteria a la raíz de una manera más estable (Michielis y col., 1991). En *Pseudomonas*, se ha descrito que las células se adhieren de forma individual a la raíz y, a medida que pasan los días van estableciendo estructuras en forma de microcolonias e incluso verdaderas biopelículas (Chin-A-Woeng y col., 1997, Dekkers y col., 2000). Mediante ensayos realizados para conseguir identificar genes implicados en la formación de biopelículas en las cepas *P. aeruginosa* PA14 y *P. fluorescens* WCS365, se encontraron varios mutantes afectados en las etapas iniciales de este proceso, a los que denominaron *sad* (del inglés *surface attachment defective*) (O'Toole y Kolter, 1998a; 1998b). La caracterización de uno de estos mutantes, el mutante *sadB*, permitió relacionar de manera inversa la capacidad de formación de biopelículas con la movilidad dependiente de flagelos tipo *swarming* (Caiazza y col., 2007). A parte de estos, se han descrito diversos mutantes afectados en la formación de biopelículas (Yousef-Coronado y col., 2008; Barahona y col., 2010; Newell y col., 2011a), muchos de ellos relacionados con el metabolismo del di-GMPc, como los del sistema Wsp (del inglés *wrinkly spreader phenotype*) (Hickman y col., 2005; Bantinaki y col., 2007) o mutantes en los genes *lap* (del inglés *large adhesive protein*) (Espinosa-Urgel y col., 2000; Hinsu y col., 2003; Yousef-Coronado y col., 2008; Newell y col., 2009; Martínez-Gil y col., 2010; Newell y col., 2011b).

En resumen, la movilidad (y por tanto, el estilo de vida que adoptará la bacteria) se encuentra regulada a todos los niveles, a través de alteraciones en la expresión de los

genes flagelares, del ensamblaje de sus productos codificantes y de la velocidad de rotación del flagelo ensamblado.

3.2. La variación de fase

El fenómeno de variación de fase consiste en la diversificación de una población microbiana en varias subpoblaciones fenotípica y genotípicamente distintas, y se define como el proceso que produce cambios fenotípicos de alta frecuencia, mediados por mutaciones, reorganizaciones o modificaciones en el ADN (Saunders y col., 2003). Es un fenómeno relacionado con microorganismos que ocupan nichos heterogéneos de condiciones cambiantes, en los que la variación de fase provocaría la aparición de una población mixta, capaz de colonizar distintas partes del ecosistema, donde siempre una parte de la población podría sobrevivir ante cualquier cambio ambiental (Dybvig, 1993).

Desde el punto de vista molecular, los cambios reversibles o irreversibles producidos en el genoma de la bacteria pueden ocurrir por distintos mecanismos, uno de los más estudiados es el de la actuación de recombinasas específicas de sitio que provocan inversiones o deleciones en regiones específicas del genoma por recombinación de secuencias homólogas (Abraham y col., 1985).

XerC en *E. coli* y Sss en *pseudomonas*, son proteínas con actividad recombinasa, de la familia λ -integrasas, implicadas en la segregación del cromosoma y en la variación de fase, respectivamente. Estas enzimas promueven la recombinación conservativa recíproca, entre dos pequeñas secuencias homólogas de ADN (de unos 15 pb), que no requiere síntesis de ADN. La presencia y orientación de dos de estas secuencias llevará a la inversión o escisión del fragmento de ADN situado entre ambos sitios de reconocimiento (Sadowski, 1986). La mayoría de los reordenamientos de ADN implicados en el cambio fenotípico regulan la expresión de fimbrias, flagelos, LPS y lipoproteínas (Lugtenberg y col., 2001).

En la colonización competitiva de la rizosfera, se ha descrito que uno de los factores más importantes es la variación de fase (van den Broek y col., 2005). Mutantes en el gen que codifica la recombinasa específica de sitio *sss* en la cepa *P. fluorescens* WCS365, presentaban una reducida capacidad de colonizar el ápice radicular en raíces de tomate (Dekkers y col., 1998b). También durante la colonización de la rizosfera de

alfalfa se aislaron distintos variantes fenotípicos de la cepa *P. fluorescens* F113, que contenían mutaciones en el sistema de dos componentes *gacAS*, siendo *sss* el principal responsable de dicha variación (Sanchez-Contreras y col., 2002; Martinez-Granero y col., 2005). En la colonización de *Arabidopsis thaliana* por *Pseudomonas brassicacearum* NFM421, se observó también la existencia de dos tipos de células morfológicamente distintas, denominadas fase I y fase II. Estas últimas mostraban sobreproducción de flagelina y un aumento en su movilidad tipo *swimming* y *swarming* comparadas con las de fase I (Achouak y col., 2004).

Efectos parecidos se han descrito en el segundo tipo de mecanismo responsable de la variación fenotípica en pseudomonas: mutaciones espontáneas en el sistema *gacA/gacS*. Este sistema regula la síntesis de metabolitos secundarios y la producción de exoenzimas en pseudomonas (Laville y col., 1992; Rich y col., 1994; Kitten y col., 1998; Blumer y col., 1999; van den Broek y col., 2003). Este tipo de variantes fenotípicos se han encontrado principalmente en la rizosfera de plantas colonizadas por especies de *Pseudomonas* con capacidad de biocontrol sobre determinados fitopatógenos (Rich y col., 1994; Duffy y Défago, 2000; Bull y col., 2001; Chancey y col., 2002; Sanchez-Contreras y col., 2002; Schmidt-Eisenlohr y col., 2003; van den Broek y col., 2003). Sin embargo las subpoblaciones con mutaciones en el sistema Gac no producen compuestos antimicrobianos como ácido cianhídrico, proteasa, lipasa, DAPG, pioluteorina o pirrolnitrina (Rich y col., 1994; Han y col., 1997; Duffy y Défago, 2000; Schmidt-Eisenlohr y col., 2003; van den Broek y col., 2003), estando también limitados en la comunicación por QS y formación de biopelículas (Schmidt-Eisenlohr y col., 2003). En la población mixta generada por el fenómeno de variación de fase, los mutantes *gac* presentarían cierta ventaja en colonización, mientras que la estirpe silvestre conservaría intacta sus capacidades de biocontrol (Chancey y col., 2002; Schmidt-Eisenlohr y col., 2003).

La variación de fase afecta a las interacciones huésped-patógeno, pero también a la colonización de la rizosfera, la capacidad de biocontrol y la expresión de metabolitos secundarios, ya que muchos factores como la movilidad, la producción de metabolitos antifúngicos, biosurfactantes, quitinasas, lipasas y proteasas están sujetos a variación (Chin-A-Woeng y col., 2000; van den Broek y col., 2003; Mercado-Blanco y Bakker, 2007; Lugtenberg y Kamilova, 2009). En pseudomonas, el mecanismo más importante

para la aparición de variantes son mutaciones espontáneas en el sistema Gac (van den Broek y col., 2005).

3.3. Sistemas de dos componentes. El sistema de dos componentes GacA/GacS

Las bacterias perciben constantemente las condiciones del ambiente que les rodea para poder adaptar su estrategia de colonización a su ambiente, siendo uno de los mecanismos moleculares más importantes para ello los sistemas de dos componentes (Stock y col., 2000).

El clásico sistema de dos componentes está formado por una proteína sensora histidín-quinasa de membrana, que detecta el estímulo ambiental, autofosforilándose y transfiriendo este fosfato a su correspondiente regulador de respuesta. La quinasa está compuesta por un dominio de membrana variable en su extremo N-terminal, que detecta la señal, y otro dominio conservado en C-terminal que cataliza la fosforilación. En respuesta al estímulo, la quinasa se autofosforila en un residuo conservado de histidina y a continuación transfiere este fosfato a un residuo de aspartato conservado en el extremo N-terminal del componente regulador. Esta fosforilación activa a su vez a su dominio C-terminal, generando la respuesta al estímulo (Bourret y Silversmith, 2010). Estos sistemas están presentes en prácticamente todos los genomas bacterianos aunque el número de genes que los codifican puede variar mucho de unas bacterias a otras. Las señales ambientales detectadas por estos sistemas, están relacionadas entre otras con la disponibilidad de oxígeno, la limitación de fosfato y nutrientes, péptidos antimicrobianos, o moléculas implicadas en la señalización del QS (Freeman y Bassler, 1999; Otto, 2009).

Dentro de los sistemas de dos componentes clásicos que existen en *P. aeruginosa*, solo unos pocos están bien caracterizados, y algunos juegan un papel fundamental en el proceso de infección de esta cepa o de resistencia a distintos estreses (Garvis y col., 2009; Gooderham y Hancock, 2009). Por ejemplo, CzcR/CzcS y CopR/CopS, regulan la resistencia a metales pesados (Hassan y col., 1999; Perron y col., 2004; Teitzel y col., 2006; Caille y col., 2007); PmrA/PmrB está implicado en resistencia a polimixina B y péptidos antimicrobianos (McPhee y col., 2003), ParR/ParS relacionado con resistencia a polimixina B y colistina (Fernández y col., 2010), o el sistema formado por BfiSR, BfmSR y MifSR, que regulan la formación de biopelículas en distintos

estados, inicial, maduración y formación de microcolonias, respectivamente (Petrova y Sauer, 2010).

Aunque seguramente, el sistema mejor estudiado es el conformado por las proteínas GacAS/LadS/RetS, que constituyen una verdadera red compuesta por múltiples sensores y proteínas reguladoras. En conjunto, todos ellos cumplen un papel muy importante en protección y virulencia (Kay y col., 2006; Ventre y col., 2006; Goodman y col., 2009), ya que finalmente controlan la expresión de los sistemas de QS, metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, sideróforos, y otros genes implicados en citotoxicidad como los de los TTSS (Chin-A-Woeng y col., 2000; Heeb y Haas, 2001; Haas y Keel, 2003; Vasseur y col., 2005).

El sistema de dos componentes GacA/GacS (del inglés *global activation*), fue descubierto en dos cepas colonizadoras de plantas: *P. syringae*, cepa patógena donde el sistema es responsable del desarrollo de la enfermedad, y *P. fluorescens*, cepa beneficiosa en el que la acción de este sistema determina la expresión de factores de biocontrol (Hrabak y Willis, 1992; Laville y col., 1992; Rich y col., 1994).

Este sistema de regulación altamente conservado (de Souza y col., 2003), controla la producción de la mayoría de los productos secretados y factores de virulencia en pseudomonas (Heeb y Haas, 2001; Haas y Défago, 2005; Lapouge y col., 2008; Hassan y col., 2010; Sonnleitner y Haas, 2011). En la cepa *P. aeruginosa*, el sistema Gac activa la producción del autoinductor N-butilil-homoserina lactona así como la síntesis de varios factores de virulencia (Reimann y col., 1997; Burrowes y col., 2005), siendo necesario para el desarrollo de la enfermedad, en animales y plantas (Rahme y col., 1995). En general, dentro de las especies de *Pseudomonas*, este sistema se encuentra implicado en la producción de metabolitos secundarios como el DAPG, HCN, fioluteorina, fenacina, pioluteorina, IAA (Laville y col., 1992; Rich y col., 1994; Aarons y col., 2000; Zhang y Pierson, 2001; Kang y col., 2006), enzimas extracelulares y sideróforos fluorescentes (Sacherer y col., 1994; Liao y col., 1996), lipopéptidos (Koch y col., 2002; Dubern y col., 2005) o alginato (Willis y col., 2001), actuando como un activador en la regulación de la mayoría de estos productos de secreción, aunque en algunos casos, como en la producción de ramnolípidos, lipasa o pioverdina, el sistema Gac ejerce como un regulador negativo (Heurlier y col., 2004).

La cascada de transducción de señales en la que interviene este sistema (Figura 6) comenzaría con la recepción de una señal (hasta el momento desconocida) por parte de la proteína sensora de membrana GacS, capaz de autofosforilarse y fosforilar a su vez a la proteína efectora GacA, localizada en el interior celular. Cuando GacA se fosforila, activa los promotores de ARNs reguladores de pequeño tamaño, *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ*, que se unen a las proteínas represoras Rsm (del inglés *regulator of secondary metabolism*). Estas proteínas en condiciones normales se encuentran unidas a la secuencia Shine-Dalgarno de ARNm (Schubert y col., 2007), implicados en la síntesis de compuestos del metabolismo secundario de la bacteria, como antibióticos y antifúngicos y enzimas secretadas, que, al acomplejarse con los ARNs reguladores de pequeño tamaño, permiten la traducción de estos ARNm (Blumer y col., 1999; Haas y Défago, 2005; Kay y col., 2005). Además, se ha observado, que en *P. fluorescens* Pf-5, los niveles de ARNm diana de las proteínas Rsm son menores en un mutante *gacA*, y se ha sugerido que la unión de las proteínas Rsm a sus ARNm diana, provoca la degradación preferencial de dichos ARNs (Hassan y col., 2010). A su vez, las proteínas Rsm, regulan negativamente a varios represores de los promotores de *rsmXYZ*, activando la expresión de estos ARNs indirectamente (Kay y col., 2005; Humair y col., 2010).

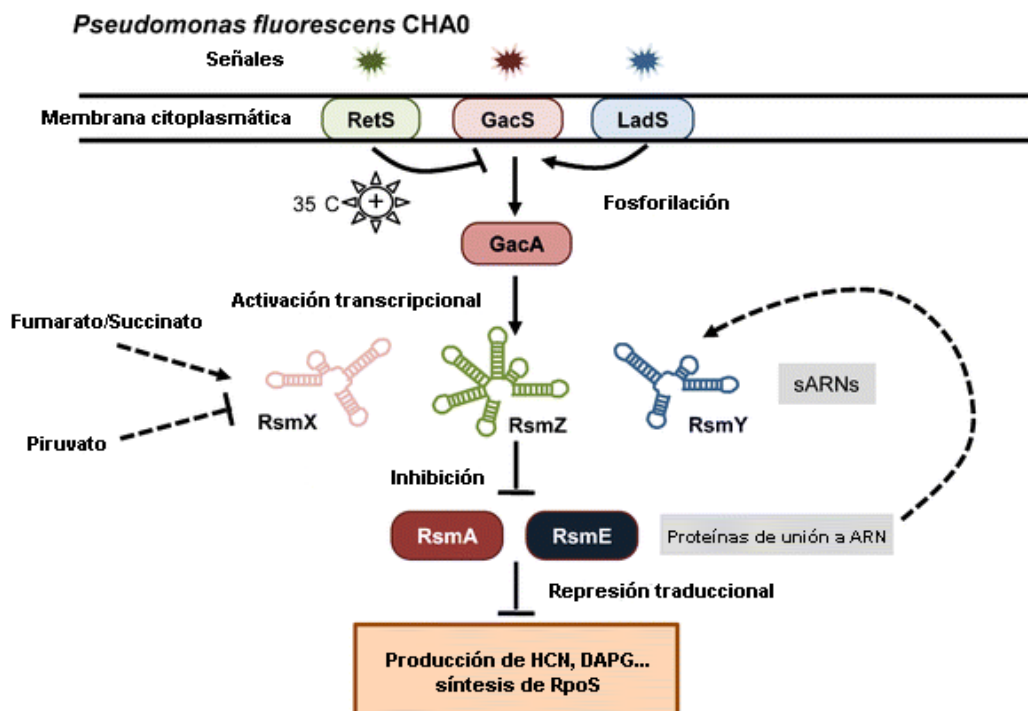


Figura 6: Modelo de la ruta de transducción de señales del sistema de dos componentes GacA/GacS en *P. fluorescens* CHA0 (modificado de Sonnleitner y Haas, 2011).

En *P. aeruginosa* se han identificado otras proteínas reguladoras de estos pequeños ARNs como son: HptB, que reprime la expresión de *rsmY* (Bordi y col., 2010), o la ARNasa G, cuya expresión está a su vez controlada por el sistema de dos componentes BfiSR, y que degrada específicamente *rsmZ* cuando se favorece la formación de biopelículas (Petrova y Sauer, 2010). Además, en esta compleja cascada de señalización se han encontrado otras proteínas reguladoras que controlan a su vez la activación del regulador global GacS. RetS (del inglés *regulator of exopolysaccharides and TTSS*), es una proteína quinasa sensora de membrana, capaz de formar heterodímeros con GacS, provocando su inhibición (Goodman y col., 2004; 2009), mientras que LadS (del inglés *lost adherence phenotype*), otra quinasa sensora huérfana, preserva la actividad de GacS, probablemente también por contacto físico (Ventre y col., 2006; Workentine y col., 2009). En conjunto, RetS, GacS y LadS, determinan la activación o no de GacA, y en definitiva de la cascada Gac/Rsm.

En cuanto a la movilidad, en *P. aeruginosa*, se ha descrito que un mutante *rsmA*⁻ pierde la movilidad tipo *swarming* (Heurlier y col., 2004), y reduce su movilidad tipo *swimming* (Burrowes y col., 2006), mientras que un mutante *gacA*⁻ presenta mayor capacidad de movimiento tipo *swarming*, así como un aumento en la expresión de flagelina y de la proteína final del filamento (FliC y FliD, respectivamente) (Kay y col., 2006), indicando que este sistema regula negativamente ambos tipos de movilidad. Sin embargo, en pseudomonas fitopatógenas, mutaciones en *gac* producen una disminución en la movilidad tipo *swarming* (Kinscherf y Willis, 1999; Chatterjee y col., 2003). En la cepa *P. fluorescens* F113, mutantes en el gen *gacS* o *gacA*, presentan una capacidad de movimiento tipo *swimming* incrementada (Martínez Granero y col., 2006), una disminución en la formación de biopelículas en superficies abióticas (Barahona y col., 2010) y menor capacidad de biocontrol (Barahona y col., 2011), con respecto a la estirpe silvestre. La represión de la movilidad parece llevarse a cabo, al igual que en otras pseudomonas, a través de las proteínas RsmA y RsmE, que activan la síntesis de compuestos del metabolismo secundario pero mantienen reprimida su capacidad de movimiento, mediante la represión de la transcripción de *fleQ*, el gen regulador principal en la biosíntesis del flagelo en pseudomonas (Martínez-Granero, 2006).

En *P. fluorescens* F113, el fenómeno de variación de fase es consecuencia de la acción de las recombinasas específicas de sitio Sss y XerD (Sánchez-Contreras y col., 2002;

Martínez-Granero y col., 2005). Tras la sobreexpresión de cualquiera de estas dos recombinasas durante la colonización de la rizosfera, se seleccionan variantes más móviles que la estirpe inoculada, localizados preferencialmente en las zonas más lejanas al punto de inoculación. Todos estos variantes hipermóviles son mutantes en el sistema de dos componentes GacA/GacS (Martínez-Granero y col., 2006).

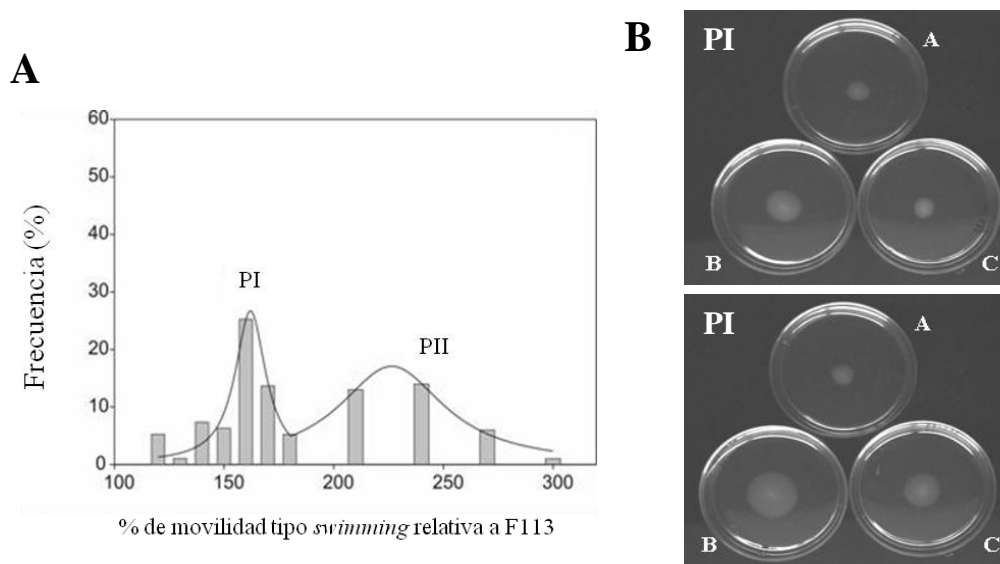


Figura 7: Movilidad de los variantes fenotípicos. **A:** Distribución de la movilidad de variantes fenotípicos tras la sobreexpresión de las recombinasas específicas de sitio, obtenidos tras la inoculación en la rizosfera de alfalfa. **B:** Movilidad tipo *swimming* de los variantes fenotípicos. (I): correspondiente al pico PI y (II): correspondiente al pico PII. Siendo A: F113, B: variante fenotípico, C: variante fenotípico complementado con los genes *gacA/gacS*. (Martínez-Granero y col., 2006).

Como se observa en la figura 7, todos estos variantes presentaron una movilidad entre un 120 y un 300% con respecto a la estirpe silvestre, aunque se podían diferenciar dos tipos de poblaciones: (i) la correspondiente al pico PI, compuesta por variantes con una movilidad en torno al 150% con respecto a la estirpe silvestre; y (ii) una segunda población hasta 3 veces más móvil que F113 (PII) (Martínez-Granero y col., 2006).

El análisis de complementación de estos variantes con la expresión en *trans* de los genes *gacA* o *gacS* demostró que todos ellos presentaban mutaciones en este sistema de dos componentes (figura 7), sin embargo, los variantes procedentes de la segunda población (PII), al complementar solo parcialmente su fenotipo de movilidad, debían presentar mutaciones adicionales que les conferían una mayor capacidad de movimiento, sugiriendo que varias rutas de regulación independientes al sistema Gac estarían reprimiendo la movilidad en *P. fluorescens* F113 (Martínez-Granero y col., 2006).

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es conocer la regulación de la movilidad dependiente de flagelos en la cepa *Pseudomonas fluorescens* F113. Este objetivo global se abordará a través de los siguientes objetivos concretos:

1. Identificar genes implicados en la represión de la movilidad de *P. fluorescens* F113, así como las rutas de regulación en las que participan. Analizar el fenotipo de movimiento tipo *swimming* de los mutantes de *P. fluorescens* F113 en genes implicados en la regulación de la movilidad.
2. Analizar las interacciones genéticas entre los distintos genes y rutas de transducción de señales y determinar si conforman o no vías de señalización independientes, para poder identificar así la red implicada en la regulación ambiental del movimiento.

Materiales y Métodos

Materiales

1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Tanto las cepas como los plásmidos usados en este trabajo se encuentran anotados en la tabla 1.

Tabla 1: Cepas y plásmidos utilizados

Cepas	Características	Referencias
DH5α	Cepa de clonaje de <i>E. coli</i>	Gibco-BRL
F113rif	<i>P. fluorescens</i> cepa silvestre Rif ^R	Shanahan y col. (1992)
F113algU	F113rif algU ⁻ Rif ^R Km ^R	Martínez-Granero y col. (en revisión)
F113amrZ	F113rif amrZ ⁻ Rif ^R Km ^R	Martínez-Granero y col. (en revisión)
F113bifA	F113rif bifA ⁻ Rif ^R Gn ^R	Este trabajo
F113fleQ	F113rif fleQ ⁻ Rif ^R Km ^R	Capdevila y col. (2004)
F113flgZ	F113rif flgZ ⁻ Rif ^R Gn ^R	Este trabajo
F113fliA	F113rif fliA ⁻ Rif ^R Km ^R	Redondo-Nieto y col. (2008)
F113gacA	F113rif gacA ⁻ Rif ^R Km ^R	Martínez-Granero y col. (2006)
F113gacS	F113rif gacS ⁻ Rif ^R Km ^R	Martínez-Granero y col. (2006)
F113gacS-2	F113rif gacS ⁻ Rif ^R Gn ^R	Navazo y col. (2009)
F113sadB	F113rif sadB ⁻ Rif ^R Km ^R	Navazo y col. (2009)
F113sadB-2	F113rif sadB ⁻ Rif ^R Gn ^R	Navazo y col. (2009)
F113sadC	F113rif sadC ⁻ Rif ^R Gn ^R	Este trabajo
F113vfr	F113rif vfr ⁻ Rif ^R Km ^R	Martínez-Granero (2006)
F113wspR	F113rif wspR ⁻ Rif ^R Spc ^R	Navazo y col. (2009)
F113algUamrZ	F113rif algU ⁻ y amrZ ⁻ Rif ^R Km ^R Gn ^R	Martínez-Granero y col. (en revisión)
F113algUsadB	F113rif algU ⁻ y sadB ⁻ Rif ^R Km ^R Gn ^R	Martínez-Granero y col. (en revisión)
F113amrZsadB	F113rif amrZ ⁻ y sadB ⁻ Rif ^R Km ^R Gn ^R	Martínez-Granero y col. (en revisión)
F113bifAflgZ	F113rif bifA ⁻ y flgZ ⁻ Rif ^R Km ^R Gn ^R	Este trabajo
F113gacSamrZ	F113rif gacS ⁻ y amrZ ⁻ Rif ^R Km ^R Gn ^R	Martínez-Granero y col. (en revisión)
F113gacSflgZ	F113rif gacS ⁻ y flgZ ⁻ Rif ^R Km ^R Gn ^R	Este trabajo
F113gacSsadB	F113rif gacS ⁻ y sadB ⁻ Rif ^R Km ^R Gn ^R	Navazo y col. (2009)
F113gacSwspR	F113rif gacS ⁻ y wspR ⁻ Rif ^R Spc ^R Km ^R	Navazo y col. (2009)
F113sadBbifA	F113rif sadB ⁻ y bifA ⁻ Rif ^R Km ^R Gn ^R	Este trabajo
F113sadBsadC	F113rif sadB ⁻ y sadC ⁻ Rif ^R Km ^R Gn ^R	Este trabajo
F113sadBwspR	F113rif sadB ⁻ y wspR ⁻ Rif ^R Km ^R Spc ^R	Navazo y col. (2009)
F113sadBwspR-2	F113rif sadB ⁻ y wspR ⁻ Rif ^R Gn ^R Spc ^R	Navazo y col. (2009)
F113sadCbifA	F113rif sadC ⁻ y bifA ⁻ Rif ^R Km ^R Gn ^R	Este trabajo
F113sadCflgZ	F113rif sadC ⁻ y flgZ ⁻ Rif ^R Km ^R Gn ^R	Este trabajo

F113 <i>wspR</i> <i>flgZ</i>	F113rif <i>wspR</i> ⁻ y <i>flgZ</i> Rif ^R Gn ^R Spc ^R	Este trabajo
F113 <i>wspR</i> <i>sadC</i>	F113rif <i>wspR</i> ⁻ y <i>sadC</i> ⁻ Rif ^R Gn ^R Spc ^R	Este trabajo
F113 <i>gacS</i> <i>sadB</i> <i>wspR</i>	F113rif <i>gacS</i> ⁻ , <i>sadB</i> ⁻ y <i>wspR</i> ⁻ Rif ^R Km ^R Spc ^R Gn ^R	Navazo y col. (2009)

Plásmidos

pGEM®T-easy vector	Vector de clonaje Amp ^R	Promega
pMP220	Vector que contiene el gen <i>lacZ</i> carente de promotor Tc ^R	Spaink y col. (1987)
pVIK107	Vector suicida Km ^R	Kalogeraki y Winans (1997)
pVLT31	Vector de expresión con promotor <i>P_{tac}</i> inducible por IPTG Tc ^R	de Lorenzo y col. (1993)
pRK2013	Plásmido coadyuvante Km ^R	Figurski y Helinski (1979)
pRK600	Plásmido coadyuvante Cm ^R	Finan y col. (1986)
pK19 <i>mobsacB</i>	Vector suicida <i>sacB</i> Km ^R	Schäfer y col. (1994)
pG18 <i>mob2</i>	Vector suicida Gn ^R	Kirchner y Tauch (2003)
pBG1410	Fusión transcripcional <i>pfl_{eQ}::lacZ</i>	Redondo-Nieto y col. (2008)
pRL1063a	Vector que contiene el transposón Tn5 <i>luxAB</i> Km ^R	Wolk y col. (1991)
pCAM140	Vector que contiene el transposón miniTn5 <i>gusA</i> Spc ^R	Wilson y col. (1995)
pBG1707	Cósmido derivado de pLFAR3 que contiene el gen <i>sadB</i> Tc ^R	Este trabajo
pBG1748	Vector derivado de pVLT31 que contiene el gen <i>rsmA</i> Tc ^R (<i>prsmA</i>)	Martínez-Granero y col. (en revisión)
pBG1749	Vector derivado de pVLT31 que contiene el gen <i>rsmE</i> Tc ^R (<i>prsmE</i>)	Martínez-Granero y col. (en revisión)
pBG1759	Vector derivado de pVLT31 que contiene el gen <i>amrZ</i> Tc ^R (<i>pamrZ</i>)	Martínez-Granero y col. (en revisión)
pBG1772	Vector derivado de pVLT31 que contiene el gen <i>rsmZ</i> Tc ^R (<i>prsmZ</i>)	Martínez-Granero y col. (en revisión)
pBG1837	Vector derivado de pVLT31 que contiene el gen <i>flgZ</i> Tc ^R (<i>pflgZ</i>)	Este trabajo
pBG1840	Vector derivado de pVLT31 que contiene la fusión <i>rsmA-HA</i> Tc ^R (<i>prsmA-HA</i>)	Martínez-Granero y col. (en revisión)
pBG1923	Vector derivado de pVLT31 que contiene la fusión <i>flgZ-eCFP</i> Tc ^R (<i>pflgZ-eCFP</i>)	Este trabajo

Amp, ampicilina; Cm, cloranfenicol; Gn, gentamicina; Km, kanamicina; Rif, rifampicina; Spc, espectinomycin; Tc, tetraciclina

2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de los mutantes generados por transposición, para la construcción de mutantes mediante mutagénesis dirigida, los análisis de expresión y sobreexpresión, e inmunoprecipitación se detallan en la tabla 2. Todos estos cebadores fueron sintetizados por el grupo Taper S.A. (Madrid, España).

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Cebador	Secuencia (5'-3')	T. anillamiento (TA) (°C)	Características
16SF	TCAGTCACACTGGAAGTGAAG	58	Para cuantificar la expresión del gen <i>16S</i> como control de expresión
16SR	CAGGCGGTCAACTTAATGCG		
algUF	TGCACGACACCCATGAAG	58	Para amplificar fragmento de 250 pb y generar mutante <i>algU</i>
algUR	GTCGACAAATCTTCGGGCA		
amrZF	GGGAACGCATTGCCGAAGTG	58	Para amplificar fragmento de 250 pb y generar mutante <i>amrZ</i>
amrZR	GCGTCATGGGCAATCAGCGAA		
amrZextF	ATGCGCCCATTGAAACAGG	58	Para amplificar el gen <i>amrZ</i> entero y sobreexpresarlo
amrZextR	TCAGGTCGCGTCTGCGG		
bifAF	GCTTGTCTGTGAAGTTGCTC	60	Para amplificar fragmento de 300pb y generar mutante <i>bifA</i>
bifAR	AAGCCATGCGTACGGCTTC		
PI-eCFPF	ATCCTGCAGCTGAGCAAGGGCGA	60	Para amplificar gen <i>CFP</i> y ligarlo en fase con <i>flgZ</i>
eCFPR	GGAGCTG TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC		
fleQF	GGCACCAGCCGGGCGAT	60	Para analizar la expresión del gen <i>fleQ</i> mediante RT-PCR
fleQR	TGACCTGCATCGGCAGCG		
flgZF	CCAGAGCTATCTGGTCAACG	60	Para amplificar fragmento de 300pb y generar mutante <i>flgZ</i>
flgZR	GAAATGTCCAGCAGCTTGCC		
flgZR2-PI	ATCCTGCAGGAGGTCGTCTTTATC GAA	60	Junto con flgZextF2 para amplificar gen <i>flgZ</i> entero y ligarlo en fase con <i>eCFP</i>
flgZextF2	GTGTTCAATGCCTCAAACGC	60	Para amplificar el gen <i>flgZ</i> entero y complementar el mutante
flgZextR2	TCAGAGGTCGTCTTTATCGAA		
fliCF	AACTCCAGCCGTGCTGA	56	Para analizar la expresión del gen <i>fliC</i> mediante RT-PCR
fliCR	GCAGCTGGTTGGCCTGG		
gacSF4	AAGCAGATCCTCACCAACC	56	Para amplificar fragmento de 400pb y generar mutante <i>gacS</i>
gacSR2	AGCACCGCCACGCGCC		
HArsmAR	TCCTGCAGTTAAGCATAATCTGGA ACATCGTATGGATAATGGCTTGGT TCGTCG	58	Junto con rsmAextF para amplificar gen <i>rsmA</i> entero fusionado con <i>HA</i>
qalgUF	GCAGGATGTCGCTCAGGAAG	60	Para amplificar fragmento de compuesto por parte de <i>algT</i> y <i>mucA</i>
qmucAR	AGGCGTGGAAGCAACAAGTC		
qalgUR	AGTTTTTCGCCGTGTTGATGG	60	Junto con qalgUF para realizar el ensayo de inmunoprecipitación
qmucAF	GACAACGAAGCGGACGAAC	60	Para amplificar fragmento de compuesto por parte de <i>mucA</i> y <i>mucB</i>
qmucBR	CTCTGCTGTTGCTCGGCTTGT		
qmucAR	AGGCGTGGAAGCAACAAGTC	60	Junto con qmucAF para realizar el ensayo de inmunoprecipitación
qmucBF	TATTCACGCTTCTGCTTGGTG	60	Junto con qmucBR para realizar el ensayo de inmunoprecipitación
qamrZF	ATGCGCCCATTGAAACAGG	60	Para cuantificar la expresión del gen <i>amrZ</i> en distintos fondos genéticos
qamrZR	GAGAGTTGTCGGAAGCGTTGA		
qfleQF	TGCTGATCCTGGGTGAGTC	60	Para cuantificar la expresión del gen <i>fleQ</i> en distintos fondos genéticos
qfleQR	ACTCGTCTCCAGCAACTC		
qfliCF	TTCCGATGCTCTGTCCACTTC	60	Para cuantificar la expresión del gen <i>fliC</i> en distintos fondos genéticos
qfliCR	GATACCGTCGTTGGCGTTCTT		
qflgA-F	GATCAAGGCGCAGGTGATG	60	Para amplificar fragmento de compuesto por parte de <i>flgA</i> y <i>flgM</i>
qflgM-R	TTCCTTGGTGGCGCTGGTA		

qflgM-F	AACAAGTCAGCAACGGGGAGT	62	Para amplificar fragmento de compuesto por parte de <i>flgM</i> y <i>flgN</i>
qflgN-R	GTTGAGGCTGGCGAGGATCT		
qflgN-F	GCCAGTCGATCCTGATGCAA	58	Para amplificar fragmento de compuesto por parte de <i>flgN</i> y <i>flgZ</i>
qflgZ-R	CAGGGCAATGGATTGGTCTC		
qhcnAF	TTCAGACCTTCTACGCCGAAA	60	Para amplificar <i>hcnA</i> como control en el ensayo de inmunoprecipitación
qhcnAR	GGACTGGATGACGGTGAGGA		
rsmAextF	ATGCTGATTCTGACTCGTC	58	Para amplificar el gen <i>rsmA</i> entero y sobreexpresarlo
rsmAextR	TTAATGGCTTGGTTCTTCGT		
rsmEextF	ATGCTGATACTACCCGCAA	58	Para amplificar el gen <i>rsmE</i> entero y sobreexpresarlo
rsmEextR	TCAGGGCGTTTGTGGCTTG		
rsmZextF	TAGCGTTACAGAGCAAGCCA	58	Para amplificar el gen <i>rsmZ</i> entero y sobreexpresarlo
rsmZextR	TTCCGATCAAGAAATCGCAG		
sadBF1	ATCATCAAGCTGCGGGTCG	58	Para amplificar fragmento de 500pb y generar mutante <i>sadB</i>
sadBR1	CAGGTGCTGTTCCACGTAG		
sadCF	TCATTACCTCGACTCGTTGC	58	Para amplificar fragmento de 640pb y generar mutante <i>sadC</i>
sadCR	ATGCGCTTGAAATGGTCGAG		
Tn5-19D	ACTTGTGTATAAGAGTCAG	52	Para amplificar secuencias adyacentes al sitio de inserción de los transposones
Tn5-19I	AGATCTGATCAAGAGACAG	54	
vfrF	ATGGTTGGTATTACCCCA	58	Para amplificar fragmento de 300pb y generar mutante <i>vfr</i>
vfrR	GGCATCGGGTTGCTTGCA		
wspRF1	CTGATGGCCGAGAACTGC	60	Para amplificar fragmento de 650pb y generar mutante <i>wspR</i>
wsprRR3	ACATCCAGGGTGATTTATTCG		

*La secuencia correspondiente al péptido Hemaglutinina (HA) está subrayada en el cebador HArsmAR

** La secuencia correspondiente a la diana de restricción reconocida por la enzima PstI (PI) está subrayada en los cebadores PI-eCFPF y flgZR2-PI.

3. Medios de cultivo y para ensayos de actividades enzimáticas

Las estirpes correspondientes a *Pseudomonas fluorescens* se cultivaron generalmente en medio de cultivo Sacarosa-Asparagina (SA) (Scher y Baker, 1982), suplementado con agar purificado (Pronadisa, Laboratorios Conda, Madrid, España) a una concentración de 1,5% (p/v) para el crecimiento en medio sólido (tabla 3). En determinados ensayos, se usó LB como medio de cultivo para *Pseudomonas* (tabla 3), añadiendo agar bacteriológico americano (Pronadisa, Laboratorios Conda, Madrid, España) al 1,5% (p/v) para medio sólido.

Por su parte, las cepas de *Escherichia coli* se crecieron en medio LB (tabla 3), añadiendo agar bacteriológico americano a una concentración de 1,5% (p/v) para el medio sólido.

Tabla 3: Composición de los medios de cultivo utilizados

Medio	Reactivos	Composición (g L ⁻¹)
SA	Sacarosa	20
	Asparagina	2
	K ₂ HPO ₄ * 3H ₂ O	1,31
	MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,5
LB	Extracto de levadura	5
	Tryptona	10
	NaCl	5

Por otro lado, se realizaron dos tipos de ensayos de movilidad: tipo *swimming* y *swarming*. La movilidad tipo *swimming* se analizó en medio SA (tabla 3) con una concentración de agar purificado de 0,3% (p/v). La movilidad tipo *swarming* se ensayó en un medio de cultivo específico, con una concentración de 0,5% (p/v) de agar bacteriológico americano, cuyos componentes se encuentran detallados en la tabla 4. Además se llevó a cabo la determinación de dos tipos de actividades enzimáticas relacionadas con mutaciones en el metabolismo secundario en dos tipos de medios. La sobreproducción de pioverdina se analizó en medio sólido LB (tabla 3), mientras que la capacidad de producir exoproteasa se ensayó en el medio detallado en la tabla 4 (Martínez-Granero y col., 2005).

Tabla 4: Composición de los medios utilizados en ensayos enzimáticos y de movilidad

Medio	Reactivos	Composición (g L ⁻¹)
<i>swarming</i>	Extracto de carne	5
	Proteosa peptona	3
	glucosa	5
Exoproteasa	Leche en polvo desnatada	30
	Extracto de levadura	3
	Tryptona	1
	Agar purificado	15

Tanto los medios de cultivo, como los utilizados en ensayos de movilidad tipo *swimming*, *swarming* y de determinación de actividad enzimática como exoproteasa fueron preparados en agua destilada y esterilizados, previo a su utilización, en el autoclave en ciclo corto (110°C, 15 min).

4. Antibióticos y reactivos de selección

Para la selección de estirpes de *P. fluorescens* F113, se utilizaron los siguientes antibióticos, cuando fue necesario, a las concentraciones que se indican a continuación ($\mu\text{g mL}^{-1}$): Rifampicina 100, Kanamicina 50, Gentamicina 3, Tetraciclina 70 y Espectinomicina 100. En el caso de cepas de *E. coli* se usaron los siguientes antibióticos ($\mu\text{g mL}^{-1}$): Kanamicina 25, Gentamicina 10, Espectinomicina 25, Tetraciclina 10, Ampicilina 100 y Cloranfenicol 30.

Estos antibióticos procedían de distintas casas comerciales: Duchefa Biochemie (Holanda), Sigma (St. Louis, MO, EEUU) y del Laboratorio Reig Jofré (Barcelona, España). Según las propiedades de dichos antibióticos se disolvieron en: (i) agua destilada y se filtraron previo a su utilización, (ii) etanol 70% (v/v) (Scharlau, Barcelona, España), o (iii) en N,N'-dimetil formamida (Merck, Darmstadt, Alemania).

Otro de los reactivos utilizados para la selección de cepas fue el compuesto 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-gal), a una concentración final de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, como sustrato de la β -galactosidasa codificada por *lacZ*, que contienen algunos vectores para poder distinguir las colonias de *E. coli* transformadas que albergan el plásmido con el fragmento de interés clonado en su interior. Este compuesto procedía de Duchefa Biochemie (Holanda), y para su uso se disolvió en N,N'-dimetil formamida (Merck, Darmstadt, Alemania).

5. Reactivos, enzimas, kits y anticuerpos

5.1. Reactivos

Los principales reactivos utilizados fueron de grado analítico y procedían de Merck (Darmstadt, Alemania), Duchefa Biochemie (Holanda), Sigma (St. Louis, MO, EEUU), Panreac (Barcelona, España), Pronadisa (Laboratorios Conda, Madrid, España) y Scharlau (Barcelona, España).

Los reactivos para electroforesis de ADN, ARN y proteínas se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, EEUU), Bio-Rad (Hércules, CA, EEUU), Duchefa Biochemie (Holanda) y Panreac (Barcelona, España). Los marcadores de peso molecular para electroforesis de ADN y ARN utilizados se obtuvieron de la casa Biotools (Biotools B&M Labs, S.A., Madrid, España), mientras que para electroforesis de proteínas procedían de Bio-Rad

(Hércules, CA, EEUU). La agarosa se obtuvo de Pronadisa (Laboratorios Conda, Madrid, España) y como agente intercalante para la visualización de ácidos nucleicos se utilizó el reactivo Gel-RedTM (Biotium, Inc., Hayward, CA, EEUU). El TRIzol[®] utilizado para la extracción y purificación del ARN se obtuvo de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU). Para la cuantificación de proteínas se utilizó el reactivo de Bradford procedente de Bio-Rad (Hércules, CA, EEUU).

5.2. Enzimas

Las enzimas de restricción y sus tampones correspondientes procedían de Takara (Laboratorios Conda, Madrid, España).

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polimerase Chain Reaction*) se utilizaron dos sistemas: (i) la polimerasa Tth 1 unidad μL^{-1} ($\text{U } \mu\text{L}^{-1}$), su tampón correspondiente 10X, MgCl_2 50mM y dNTPs 10mM (Biotools B&M Labs, S.A., Madrid, España); o (ii) la polimerasa High fidelity 5 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, junto con los reactivos del kit Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics S.L., Madrid, España).

En las reacciones de ligación se utilizaron las siguientes enzimas: (i) la enzima T4-DNA ligasa con su tampón correspondiente 10X (Promega, Madison, WI, EEUU), (ii) la T4-DNA ligasa del kit pGEM[®]T-easy vector (Promega, Madison, WI, EEUU), y (iii) la enzima T4-DNA ligasa y su tampón correspondiente 10X (New England BioLabs, Ipswich, MA, EEUU).

Para el tratamiento con ADNasa se utilizó la enzima RQ1 RNase-Free DNase con su tampón correspondiente (Promega, Madison, WI, EEUU).

Se usaron dos tipos de inhibidores de actividades enzimáticas: (i) RNase-OUTTM de Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU), y (ii) un cóctel inhibidor de proteasas de Roche Diagnostics S.L. (Madrid, España).

5.3. Kits

Para llevar a cabo la extracción de ADN genómico y plasmídico se utilizaron los kits REAL Pure extraction DNA genomic (Durviz S.L., Valencia, España) y Wizard[®] Plus SV Minipreps (Promega, Madison, WI, EEUU), respectivamente.

Por su parte, la purificación de fragmentos de ADN se realizó mediante el kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, EEUU).

Para el clonaje de fragmentos procedentes directamente de PCR se utilizó el kit pGEM®T-easy vector (Promega, Madison, WI, EEUU).

La elaboración de sondas para hibridación de fragmentos de ADN se realizó usando el kit Digoxigenin Detection Kit de Boehringer Mannheim (Roche Diagnostics S.L., Madrid, España).

La retrotranscripción de ARN se realizó mediante el uso de los componentes del kit SuperScript®III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), y la reacción de PCR cuantitativa (qPCR, del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*) se realizó con el sistema Power SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Madrid, España).

5.4. Anticuerpos

Para la detección de los fragmentos de ADN, que habían hibridado con su respectiva sonda en la técnica del *Southern blot*, se utilizó el anticuerpo primario comercial anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina, y el sustrato quimioluminiscente CSPD (Roche Diagnostics S.L., Madrid, España).

Por otro lado, para la inmunoprecipitación de ARN se utilizaron dos anticuerpos: (i) anticuerpo anti-HA (Roche Diagnostics S.L., Madrid, España), y (ii) anticuerpo control IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EEUU).

En los ensayos de *Western blot* se utilizó el antisuero anti-flagelina (de Weger y col., 1987) y como anticuerpo secundario se usó α -IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (ECL™ anti-rabbit IgG, GE Healthcare España S.A., Madrid, España).

Las membranas de nylon (Amersham Hybond™-N), y nitrocelulosa (Amersham Hybond™-ECL™) utilizadas en los ensayos de hibridación del ADN o proteínas respectivamente procedían de la casa comercial GE Healthcare España S.A. (Madrid, España).

6. Herramientas informáticas

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa informático SPSS versión 18.0.

Por otro lado, la comparación de secuencias se realizó mediante la herramienta informática BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para diseño de cebadores y análisis de secuencias de *P. fluorescens* F113 se utilizó el programa Lasergene DNASTar v. 7.00 (<http://www.dnastar.com/>), mientras que los alineamientos entre las secuencias amplificadas mediante PCR y la secuencia original de *P. fluorescens* F113, se llevaron a cabo mediante el programa BioEdit Sequence Alignment Editor for Windows (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html).

7. Equipos utilizados en este trabajo

Para poder llevar a cabo los ensayos que se describen a continuación fue necesaria la utilización de los siguientes equipos:

Quantica Techne-Baloworld Scientific Termociclador (Durviz, Valencia, España), para realizar los ensayos de qPCR, o RT-PCR (del inglés *Real Time PCR*).

Sistema de documentación de geles con quimioluminiscencia (Bio-Rad, Hércules, CA, EEUU), para la detección de las bandas de hibridación de los ensayos de *Southern* y *Western blot*.

Biofotómetro (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania), lector de placas SpectraFluor (Tecan, Männedorf, Suiza) y espectrofotómetros: (i) Nanodrop[®] (Thermo Fisher Scientific S.L.U., Waltham, MA, EEUU), y (ii) MultiSpec-1501 (Shimadzu, Kyoto, Japón), para la valoración de Densidades Ópticas (D.O.) a distintas longitudes de onda.

Transiluminador con luz ultravioleta (UV) (Bio-Rad, Hércules, CA, EEUU), para visualizar el ADN en geles de agarosa, fijar el ADN a la membrana en los ensayos de *Southern blot* y observar la sobreproducción de pioverdina.

Bioruptor[™] UCD-200 TM (Diagenode S.A., Lieja, Bélgica), para la rotura de las membranas celulares en los ensayos de inmunoprecipitación.

Microscopio Confocal Espectral Leica TCS SP5 para localización celular de proteínas mediante el uso de proteínas fluorescentes de fusión.

Métodos

1. Cultivo de bacterias

Las estirpes correspondientes a *P. fluorescens* se cultivaron a 28°C, en un agitador orbital a 240 rpm para su cultivo en medio líquido, y en estático para cultivos sólidos. Por otro lado, las cepas de *E. coli* se crecieron a 37°C, en un agitador orbital a 240 rpm para su cultivo en medio líquido, y en estático para cultivos sólidos.

En ambos casos, los medios se suplementaron con los antibióticos correspondientes para la selección de cepas, así como con el compuesto X-gal, cuando fue necesario.

2. Generación y análisis de mutantes

2.1. Mutagénesis al azar por inserción de transposones

Se realizó una mutagénesis por conjugación triparental mediante la inserción al azar de transposones, introduciendo los vectores suicidas pRL1063a y pCAM140 (tabla 2), que contenían respectivamente los transposones Tn5luxAB (Wolk y col., 1991) y miniTn5gusA (Wilson y col., 1995), en la cepa *P. fluorescens* F113. Ambos transposones presentaban un origen de replicación en *E. coli*.

Los mutantes con mayor movilidad que la cepa silvestre y que presentasen un metabolismo secundario sin alteraciones, fueron sometidos a un ensayo de *Southern blot* (Southern, 1975) para comprobar que contenían una única copia del transposón insertada en su genoma. Para determinar el lugar de inserción del transposón, el ADN genómico de los mutantes seleccionados se digirió con las enzimas EcoRI (Tn5luxAB) o PstI (miniTn5gusA), se religaron los fragmentos resultantes y se transformaron en células competentes de *E. coli*. Los plásmidos que contuviesen alguno de los dos transposones, se mantendrían en las cepas de *E. coli* debido a su origen de replicación, y fueron aislados y secuenciados (Servicio de Secuenciación del Parque Científico de Madrid) usando oligonucleótidos diseñados en los extremos de los transposones (tabla 2). Usando la herramienta informática BLAST, y por comparación de secuencias, se determinó qué gen había sido interrumpido por la inserción del transposón en cada caso.

2.2. Construcción de mutantes por mutagénesis dirigida

La construcción de mutantes mediante mutagénesis dirigida se llevó a cabo por inserción de los vectores suicidas *pk19mobsacB* (Schafër y col., 1994), *pG18mob2* (Kirchner y Tauch, 2003) o *pVIK107* (Kalogeraki y col., 1997), que llevaban un fragmento interno del gen que se quería interrumpir en cada caso. Para ello, se amplificó un fragmento interno del gen diana, utilizando cebadores específicos (tabla 2) mediante PCR, que se clonaron en el vector *pGEM[®]T-easy* (tabla 1) y se transformaron en la cepa de *E. coli* DH5 α . Todos los fragmentos obtenidos mediante esta técnica fueron secuenciados por el método de dideoxi (por el Servicio de Secuenciación del Parque Científico de Madrid) y, usando la herramienta informática BLAST, por comparación de secuencias, se comprobó que se correspondían con la parte del gen que se quería amplificar en cada caso. Tras la extracción de los plásmidos que contenían los fragmentos de interés clonados, se digirieron con enzimas de restricción y se clonaron en los vectores suicidas mencionados anteriormente. Las distintas construcciones fueron introducidas en la cepa silvestre *P. fluorescens* F113 o mutantes derivados, por conjugación triparental, de modo que tras la recombinación homóloga, el gen diana quedase interrumpido por inserción del vector suicida. Este método se utilizó para la construcción tanto de mutantes simples como dobles y triples mutantes. Los transconjugantes se comprobaron mediante las técnicas de *Southern blot* y PCR.

2.3. Construcción de cepas para sobreexpresión de genes

Para la construcción de plásmidos de sobreexpresión o complementación genética de determinados mutantes, se utilizó el vector de expresión *pVLT31* (tabla 1), el cual porta un promotor tipo *Ptac* inducible por el compuesto isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), y un origen de replicación reconocido por las cepas de *Pseudomonas*. Los genes de interés, amplificados mediante PCR utilizando los cebadores correspondientes (tabla 2), se clonaron en primer lugar en el vector *pGEM[®]T-easy* (tabla 1), se transformaron en la cepa de *E. coli* DH5 α y se secuenciaron por el método de dideoxi (Servicio de secuenciación del Parque Científico de Madrid), para comprobar que no existían errores en la secuencia clonada. Por otro lado, algunas complementaciones se realizaron a partir de la introducción de un cósmido derivado de *pLFAR3* (tabla 2), portador del gen de interés, en la cepa con ese gen mutado.

En el caso de las construcciones *prsmA-HA* (tabla 1), utilizado para el ensayo de inmunoprecipitación de ARN, la secuencia nucleotídica correspondiente al péptido Hemaglutinina (HA) se fusionó en fase con la del gen *rsmA* en el extremo C-terminal, mediante amplificación por PCR con el cebador portador de dicha secuencia (tabla 2). Por otro lado, la construcción *pflgZ-eCFP*, para visualización por microscopía confocal de la proteína fluorescente azul eCFP (del inglés *Cyan Fluorescent Protein*), se realizó mediante la ligación de dos productos de PCR independientes. Las secuencias correspondientes a los genes *flgZ* y *eCFP* se amplificaron por separado utilizando oligonucleótidos con dianas PstI en los extremos C-terminal y N-terminal respectivamente (tabla 2), y a continuación se ligaron ambas secuencias en fase. Posteriormente, con ambas construcciones (*prsmA-HA* y *pflgZ-eCFP*), se siguió el mismo procedimiento descrito en este apartado: clonaje en el vector pGEM[®]T-easy, transformación de *E. coli* DH5 α y secuenciación. Tras extraer los plásmidos que contenían los fragmentos de interés, se digirieron con enzimas de restricción y se clonaron en el vector pVLT31.

Las distintas construcciones fueron introducidas en F113, o mutantes derivados de esta cepa, por conjugación triparental.

2.4. Técnicas utilizadas para generar mutantes y sobreexpresar genes

2.4.1. PCR

A partir de cultivo sólido de la colonia correspondiente (inoculando los tubos de reacción con un palillo dental), o de 50 ng de ADN genómico extraído, se procedió a la amplificación de fragmentos mediante PCR utilizando parejas de oligonucleótidos específicos para cada fragmento o gen entero (tabla 2). Teniendo en cuenta que tanto la temperatura de anillamiento (TA) como el tiempo de elongación fue variable, en función de la pareja de cebadores utilizada (tabla 2), y del tamaño del fragmento a amplificar (30 s por cada 500 pb), se utilizaron las siguientes condiciones:

Tabla 5: Programa utilizado para la amplificación por PCR

Fases	Desnaturalización		Anillamiento	Elongación		Mantenimiento
Temperatura (°C)	94	94	TA*	72	72	14
Tiempo	5 min	30 s	30 s	30 s por cada 500 pb	7 min	∞
x 25 ciclos						

* La temperatura de anillamiento (TA) depende de la pareja de oligonucleótidos utilizada (tabla 2)

Para la generación de mutantes, se procedió a la amplificación de fragmentos internos de los distintos genes. Los tubos de reacción se prepararon utilizando los reactivos necesarios según las condiciones recomendadas por el fabricante (Biotools B&M Labs, S.A., Madrid, España), para un volumen final de 25 μL : 1 μL de cada cebador a concentración 10 μM , 2,5 μL de tampón 10X, 0,5 μL de dNTPs 10 mM, 1 μL de MgCl_2 50mM, y 1 μL de polimerasa Tth de una concentración 1 U μL^{-1} . Con objeto de llevar a cabo las amplificaciones de genes enteros se utilizó el kit Expand High Fidelity PCR System. A los tubos de reacción se le añadieron 50 ng de ADN genómico, 0,5 μL de la polimerasa High Fidelity de una concentración 5 U μL^{-1} , 1 μL de cada cebador a concentración 10 μM , 10 μL del tampón correspondiente 5X, que lleva incorporado MgCl_2 , y 1 μL de dNTPs 10 mM, para un volumen de 50 μL .

2.4.2. Extracción de ADN genómico y plasmídico

El ADN genómico se aisló a partir de cultivo líquido de las cepas de interés, siguiendo el protocolo de extracción de ADN genómico para cultivos de bacterias Gram negativas del kit REAL Pure extraction DNA genómico.

Por su parte, el ADN plasmídico se extrajo a partir de cultivo líquido de *E.coli* transformadas, mediante el kit de extracción Wizard[®] Plus SV Minipreps, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cantidad y calidad tanto del ADN genómico como del plasmídico se valoró utilizando el espectrofotómetro Nanodrop[®].

2.4.3. Reacciones enzimáticas y purificación del ADN

(i) Digestión con enzimas de restricción

Para las digestiones enzimáticas, tanto del ADN genómico como plasmídico, se utilizaron distintas enzimas de restricción (EcoRI, EcoRV, PstI, BamHI...), con su tampón correspondiente y a la temperatura indicada en cada caso (30° o 37°C). En el caso de ADN genómico se procedió a la digestión de 5 μg de ADN, con 1 μL de enzima a 1 U μL^{-1} y 4 μL de su tampón 10X correspondiente, en un volumen final de 40 μL durante 4-16 h. Para el ADN plasmídico se usaron 2 μg de ADN extraído, con 1 μL de

enzima a 1 U μL^{-1} y 4 μL de su tampón 10X correspondiente, en un volumen de 40 μL entre 1-2 h.

(ii) Purificación de fragmentos de ADN

La purificación de fragmentos de ADN se realizó utilizando el kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System, siguiendo el protocolo especificado por el fabricante según si el fragmento a purificar proviniese de producto de PCR, o tras su resolución mediante electroforesis en geles de agarosa.

(iii) Ligación de fragmentos de ADN

En cuanto a las reacciones de ligación se siguieron tres métodos distintos. (i) Con los fragmentos procedentes de las digestiones del ADN genómico de los mutantes por transposición al azar, se llevó a cabo una ligación con 20 μL de fragmento en un volumen de 200 μL (para favorecer las religaciones de los fragmentos digeridos), 1 μL de la enzima T4-DNA ligasa y 20 μL de su tampón correspondiente 10X (Promega, Madison, WI, EEUU), durante 16 h a 18°C. (ii) Los fragmentos que no portaban dianas de restricción, como aquellos amplificados directamente por PCR, se clonaron en el vector pGEM®T-easy (tabla 1) según el protocolo de ligación descrito en este kit. (iii) Por otro lado, los fragmentos procedentes de digestiones con enzimas de restricción se ligaron en los vectores correspondientes (tabla 1) utilizando 1 μL del vector previamente digerido, 7,5 μL del fragmento a clonar, 0,5 μL de la enzima T4-DNA ligasa y 1 μL de su tampón correspondiente 10X (New England BioLabs, Ipswich, MA, EEUU), en un volumen de 10 μL , durante 2-4 h a temperatura ambiente.

2.4.4. Electroforesis en geles de agarosa

Tanto el ADN procedente de amplificaciones por PCR o tratado con enzimas de restricción, como el ARN extraído, se resolvió en geles horizontales de agarosa con una concentración (p/v) variable entre el 0,8% y el 1,5% (en función de los fragmentos esperados), preparados y sumergidos en tampón TAE (tabla 6) (Sambroock y col., 1989).

Tabla 6: Soluciones utilizadas para la electroforesis en geles de agarosa

Solución	Componentes
Tampón TAE	40mM Tris-Acetato 1mM EDTA pH 8 (del inglés <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
Tampón de carga	60% (v/v) de glicerol 5% (v/v) de EDTA 0.5M pH 8 10% (p/v) de azul de bromofenol (opcional)

Para ello, antes de cargarlas, las muestras se mezclaron con una proporción 1:6 (v/v) de tampón de carga (tabla 6).

2.4.5. Transformación de cepas de *E.coli*

Se procedió a la generación de células competentes de *E.coli* DH5 α siguiendo el método de permeabilización de membrana con cloruro cálcico (Mandel y Higa, 1970), con la modificación descrita por Kushner (1978), con el uso de iones bivalentes. Estas células se incubaron con el vector que llevaba clonado el fragmento de interés en cada caso durante 20 min a 4°C, y a continuación se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 2 min. Tras 10 min a 4°C, las células se cultivaron en medio líquido LB, a 37°C 1 h para permitir la adquisición de las resistencias correspondientes, y después se sembraron en placas de LB suplementadas con el antibiótico de selección, y en su caso con el compuesto X-gal.

2.4.6. Conjugación

Las conjugaciones entre cepas de *P. fluorescens* F113 (receptoras) y *E.coli* portadoras de los plásmidos de interés (donadoras) se llevaron a cabo en placas con medio LB sin antibiótico a 28°C, mediante conjugación triparental. Se utilizaron los plásmidos coadyuvantes pRK2013 (Figurski y Helinski, 1979) y pRK600 (Finan y col., 1986), portadores de los genes *tra* (tabla 2), para la movilización de los plásmidos desde las cepas donadoras. Tras 16 h se sembraron en placas con medio SA con rifampicina, y los antibióticos de selección necesarios en cada caso, para que tuviese lugar el crecimiento únicamente de las colonias transconjugantes.

2.4.7. Hibridación del ADN o *Southern blot*

Las posibles colonias transconjugantes que habían crecido en el medio de selección, se comprobaron mediante la realización de la técnica de *Southern blot* (Southern, 1975). El ADN genómico previamente extraído y digerido, se resolvió en geles de agarosa al 0,8% (p/v). A continuación, se procedió a la depurinización (10 min), desnaturalización (30 min) y neutralización (30 min) de dicho ADN mediante incubación en varias soluciones (tabla 7), en agitación y a temperatura ambiente. Seguidamente, fue transferido por capilaridad utilizando solución SSC 20X (del inglés *Saline-Sodium-Citrate*) (tabla 7) a una membrana de nylon, a temperatura ambiente durante toda la noche. El ADN quedó fijado a la membrana mediante exposición durante 5 min, a luz ultravioleta en un transiluminador, a continuación se incubó en un tampón de prehibridación a 42°C (tabla 7) durante al menos 2 h, y posteriormente se hibridó con la sonda correspondiente a 42°C durante toda la noche.

Tabla 7: Soluciones utilizadas para *Southern blot*

Solución	Componentes
Depurinización	250 mM HCl
Desnaturalización	1,5M NaCl 500mM NaOH
Neutralización	1,5M NaCl 500mM Tris-HCl (pH 7.5)
SSC 20X	3M NaCl 300 mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇
Prehibridación e Hibridación	25% (v/v) SSC 20X 50% (v/v) formamida 5% (p/v) Blocking reagent 0,1% (p/v) sarkosyl 0,02% (p/v) SDS
Solución 1	2X SSC 0,1% (p/v) SDS
Solución 2	0,1X SSC 0,1% (p/v) SDS
<i>Buffer</i> 1	100mM Tris-HCl (pH 7.5) 150mM NaCl
Tampón de fosfatasa alcalina	100mM Tris-HCl (pH 9.5) 100mM NaCl

Las sondas para comprobar que los mutantes por transposición al azar presentaban una única copia del transposón, se elaboraron con un fragmento interno del transposón,

mientras que en el caso de los mutantes generados por mutagénesis dirigida, se hizo a partir del ADN procedente de la amplificación de los fragmentos internos de los genes que se querían interrumpir. En ambos casos se utilizó el Digoxigenin Detection Kit de Boehringer Mannheim, según el protocolo de Feinberg y Vogelstein (1983) para sondas no radiactivas.

Tras la incubación, la membrana se sometió a una serie de lavados para eliminar el exceso de sonda, solución 1 (2 lavados de 5 min a 42°C) y solución 2 (1 lavado de 10 min y otro de 5 min, a 68°C) (tabla 7) y se bloqueó la membrana con 5% (p/v) de leche desnatada disuelta en *buffer* 1 (tabla 7) durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se procedió a la incubación de la membrana con el anticuerpo primario anti-digoxigenina, conjugado con fosfatasa alcalina en *buffer* 1 con 5% (p/v) de leche, 30 min a temperatura ambiente. Después de eliminar las uniones inespecíficas mediante lavados con ese mismo tampón (3 lavados de 10 min), se incubó 5 min en tampón de fosfatasa alcalina (tabla 7), y a continuación se introdujo la membrana en una bolsa de hibridación con ese mismo tampón al que se le añadió el sustrato quimioluminiscente CSPD. La detección de las bandas de hibridación se llevó a cabo utilizando un sistema de documentación de geles con quimioluminiscencia.

3. Caracterización fenotípica de los mutantes

3.1. Ensayos de movilidad

Los ensayos de movilidad tipo *swimming* se realizaron en placas con medio SA (tabla 3) a una concentración de agar purificado de 0,3% (p/v), que se inocularon introduciendo un palillo dental estéril con la cepa a ensayar, sin llegar a tocar el fondo, y se incubaron a 28°C. Las medidas de los halos de *swimming* se tomaron 18 h después de la inoculación. La librería de mutantes procedentes de la inserción de transposones se inoculó por duplicado en placas cuadradas de 10 x 10 cm que contenían 100 mL del mismo medio, mientras que tanto los mutantes con mayor movilidad una vez seleccionados, como los generados mediante mutagénesis dirigida, se analizaron por cuadruplicado en placas individuales de 50 mm de diámetro con 12 mL de SA 0,3%.

Los experimentos de *swarming* se llevaron a cabo en un medio de cultivo que contenía los compuestos especificados en la tabla 4 con una concentración de 0,5% (p/v) de agar bacteriológico americano. Estas placas se inocularon con 20 µL de cultivo líquido en

fase de crecimiento exponencial, de las cepas de interés sobre la superficie del medio, y se incubaron a 28°C. Las dendritas del *swarming* se observaron tras 14 h.

3.2. Identificación de alteraciones en el metabolismo secundario

Tanto con los mutantes seleccionados procedentes de la inserción de transposones, como con aquellos generados mediante mutagénesis dirigida, se llevó a cabo la determinación de actividad exoproteasa y producción de pioverdina en condiciones no deficientes de hierro (Martínez-Granero y col., 2005), descartando aquéllos que mostraron un fenotipo *gac*⁻, es decir, que presentaban alteraciones en el metabolismo secundario (exoproteasa negativa y sobreproducción de pioverdina en medio LB). La capacidad de producir exoproteasa se ensayó en el medio detallado en la tabla 4, por aparición de un halo transparente de degradación de las proteínas de la leche alrededor de la cepa a ensayar, tras 48 h de incubación a 28°C. Por otro lado, la sobreproducción de pioverdina, en condiciones no deficientes de hierro, de los cultivos crecidos en placas con medio LB a 28°C durante 24 h, se observó por exposición de dichas placas a luz UV en un transiluminador.

3.3. Ensayos de formación de biopelículas

Los ensayos de formación de biopelículas se realizaron siguiendo el método descrito por Fletcher (1977) con las modificaciones descritas por Barahona y col. (2010). Los cultivos de la cepa silvestre y los mutantes de interés crecidos en medio LB líquido, se diluyeron hasta una D.O.₆₀₀ = 0,04 en medio SA y 100 µL de estos cultivos se incubaron en placas multipocillo de poliestireno, de manera estática a 28°C. Se realizaron ocho réplicas para cada caso. Pasadas 8 h se añadieron 25 µL de cristal violeta 1% (p/v) en cada pocillo y se incubaron 15 min a temperatura ambiente. Tras varios lavados con agua para eliminar el exceso de colorante, se procedió a la extracción del colorante de las células adheridas a la placa con 200 µL etanol 95% (v/v), durante toda la noche en agitación. Por último se obtuvo la lectura de D.O.₅₉₅ en cada pocillo mediante un lector de placas SpectraFluor.

4. Análisis de expresión

4.1. Análisis transcripcional

4.1.1. Extracción de ARN

El ARN de las cepas de interés se extrajo siguiendo el protocolo de extracción con TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), con algunas modificaciones (Barahona, 2011). Se centrifugaron 50 mL de los cultivos crecidos a D.O.₆₀₀ entre 0,8-1 a 4°C durante 5 min a 5.000 rpm y se resuspendió el pellet en 1 mL de TRIzol. Se añadieron 200 µL de cloroformo por cada mL de TRIzol, se agitaron vigorosamente los tubos y se incubaron 2-3 min a temperatura ambiente. Centrifugamos 15 min a 4°C y 12.000 rpm, recogimos la fase superior, menos densa, en otro tubo y le añadimos 0,5 mL de isopropanol por cada mL de TRIzol para precipitar el ARN. Se incubaron los tubos durante 2 h a -20°C y a continuación, se centrifugaron 10 min a 4°C a 12.000 rpm. Se descartó el sobrenadante, el sedimento se lavó con etanol 70% (v/v) (1 mL por cada mL de TRIzol) y de nuevo se centrifugaron los tubos 5 min a 4°C a 7.500 rpm. Tras dejar secar el sedimento 3 min a temperatura ambiente, para que se eliminasen los restos que pudiesen quedar de etanol, se resuspendió finalmente en 20-50 µL de agua miliQ estéril.

4.1.2. Cuantificación, tratamiento con ADNasa y purificación

La cuantificación y calidad del ARN obtenido tras la extracción se determinó en el espectrofotómetro Nanodrop®. A continuación se realizó un tratamiento con ADNasa (RQ1 RNase-Free DNase) para eliminar los posibles restos de ADN que pudiesen quedar en la muestra. Se utilizaron 15 µg de ARN para una reacción de 50 µL de volumen final, y se añadió: 1 U de RQ1 DNase (1U µL⁻¹) por cada µg de ARN, y 0,1 µL de tampón RQ1 DNase 10X y 0,05 µL de RNase-OUT™ (40 U µL⁻¹), por cada µL de reacción. Estos tubos se incubaron a 37°C durante 30 min para que tuviese lugar la reacción de degradación del ADN. Pasados los 30 min, se procedió a la purificación de la muestra siguiendo el mismo protocolo que para la extracción de ARN, pero utilizando 250 µL de TRIzol (500 µL de TRIzol por cada 100 µL de volumen de reacción de ADNasa) y empleando los volúmenes correspondientes de cada uno de los reactivos en cada caso. Finalmente, el ARN tratado se resuspendió en 10 µL de agua miliQ estéril y se valoró en el espectrofotómetro Nanodrop®.

4.1.3. Síntesis de ADNc

Antes de llevar a cabo la síntesis de ADNc, se procedió a comprobar que el ARN extraído y tratado, no estaba contaminado con restos de ADN, ni se encontraba degradado. Este ARN se resolvió en geles horizontales de agarosa al 1% (p/v), en donde se podía comprobar la integridad del ARN mediante la visualización de las bandas correspondientes al ARNr, y además se realizó una PCR (tabla 8) partiendo de 50 ng de los distintos ARN con cebadores que amplificaban el gen 16S de *P. fluorescens* F113 (tabla 2), para descartar la posible contaminación del ARN con ADN genómico.

Tabla 8: Programa utilizado para descartar contaminación de ARN con ADN

Fases	Desnaturalización		Anillamiento	Elongación		Mantenimiento
Temperatura (°C)	94	94	58	72	72	14
Tiempo	3 min	30 s	30 s	30 s	7 min	∞
x 25 ciclos						

Una vez realizadas estas comprobaciones se procedió a la síntesis de ADNc, mediante retrotranscripción a partir de 1 µg de ARN, utilizando como cebadores una mezcla de hexanucleótidos al azar y el kit SuperScript[®]III First-Strand Synthesis System, siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.1.4. PCR cuantitativa (qPCR)

La reacción de PCR cuantitativa o qPCR se realizó utilizando el sistema Power SYBR[®]Green PCR Master Mix. Para ello, partimos de 1 µL de la reacción de síntesis de ADNc, al que se le añadieron 0,8 µL de cada uno de los oligonucleótidos 10 µM, correspondientes a los genes cuya expresión se quería analizar (tabla 2), y 10 µL de SYBR-green *mix* 2X en un volumen final de 20 µL, en las siguientes condiciones:

Tabla 9: Programa utilizado para la amplificación por qPCR

Fases	Desnaturalización		Anillamiento	Elongación	Mantenimiento
Temperatura (°C)	94	94	TA*	72	14
Tiempo	10 min	15 s	30 s	30 s	∞
x 35-40 ciclos					

* La temperatura de anillamiento (TA) varió según la pareja de cebadores utilizada (tabla 2)

En todos los casos, la expresión génica se normalizó usando el gen *16S* como control de expresión constitutivo de las distintas cepas analizadas. Además, cada ensayo de expresión se realizó por triplicado y con tres réplicas en cada caso.

4.1.5. Inmunoprecipitación de ARN

La inmunoprecipitación del ARN (IP-ARN) se realizó usando el método descrito por Lin y col. (2005), con algunas modificaciones. Los cultivos de la cepa silvestre F113, que llevaban la construcción *prsmA-HA* (tabla 1), se indujeron durante 3 h con 1 mM de IPTG y a continuación se fijaron con formaldehído al 1% (v/v), durante 10 min a temperatura ambiente. Para detener esta reacción se añadió glicina a una concentración final de 120 mM, 10 min a temperatura ambiente. Las células se sedimentaron mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 15 min a 4°C y se realizaron dos lavados con tampón PBS pre-enfriado (del inglés *Phosphate Buffer Saline*) (tabla 10).

Tabla 10: Soluciones utilizadas para el análisis transcripcional

Solución	Componentes
Tampón PBS (pH 7.4)	137 mM NaCl
	10 mM Na ₂ HPO ₄
	2,7 mM KCl
	1,4 mM KH ₂ PO ₄
Tampón de sonicación no iónico	50 mM Tris-HCl pH 8
	150 mM NaCl
	5 mM EDTA
	1% (v/v) Triton X-100
	0,5% (v/v) NP-40
Tampón TE	1 mM DTT
	10mM Tris-HCl pH 8
	1mM EDTA pH 8
Tampón Z	60 mM Na ₂ HPO ₄
	40 mM NaH ₂ PO ₄
	0,01 N KCl
	50 mM β-mercaptoetanol
	1 mM MgSO ₄

Estas células se lisaron en un tampón de sonicación no iónico (tabla 10) al que se le añadió un cóctel inhibidor de proteasas y RNaseOUT™, y se sonicaron utilizando el Bioruptor™ UCD-200 TM en las siguientes condiciones: power H, 30 s ON- 30 s OFF,

durante un total de 10 min. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación, y el lisado se dividió para la inmunoprecipitación con 5 µg bien de anticuerpo anti-HA o con el anticuerpo control IgG; y 30 µL de Dynabeads[®] protein G (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Tras cuatro lavados con el tampón de sonicación y dos con tampón TE (tabla 10) a 4°C, las muestras procedentes de la inmunoprecipitación, se sometieron a un tratamiento con ADNasa (ver apartado 4.1.2); para, a continuación proceder a la retrotranscripción del ARN, mediante síntesis de ADNc (ver apartado 4.1.3) y qPCR (ver apartado 4.1.4) usando los cebadores apropiados (tabla 2). Cada ensayo se realizó tres veces y por triplicado.

4.1.6. Ensayos de actividad β -galactosidasa

La actividad β -Galactosidasa se determinó según el método de Miller (1972), usando una fusión transcripcional del promotor del gen *fleQ* con el gen *lacZ* del plásmido pMP220 carente de promotor (Redondo-Nieto y col., 2008) (tabla 2). Se analizó la actividad por triplicado y tres veces, de distintos cultivos de *P. fluorescens* F113 y derivados, crecidos en medio LB a una D.O.₆₀₀ entre 0,75-0,95, que se corresponde con la transición entre la fase de crecimiento exponencial a fase estacionaria, momento en el que comienza la síntesis del flagelo en la cepa silvestre (Martínez-Granero y col., en revisión). Las cepas crecidas en las mismas condiciones que las anteriores y que llevaban el vector pMP220 vacío se usaron como controles negativos. Para ello se prepararon los tubos de reacción con 700 µL de los cultivos de interés y 300 µL de tampón Z (tabla 10), a los que se añadieron 10 µL de SDS (del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*) al 0,1 % (p/v) y 20 µL de cloroformo, mediante agitación con vortex, a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron a cada tubo 200 µL de orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), a concentración 4 mg mL⁻¹ disuelto en tampón Z. Las muestras se incubaron a 28°C hasta detectar el color amarillo, característico de la hidrólisis del ONPG por parte de la enzima β -galactosidasa, y se paró la reacción con 300 µL de Na₂CO₃ 1 M. La D.O.₄₂₀ de los tubos se midió en el espectrofotómetro MultiSpec-1501.

4.2. Análisis traduccional

4.2.1. Extracción y cuantificación de proteínas

Se procedió a la separación de los flagelos mediante agitación por vortex durante 2 min y posterior centrifugación a 7.500 rpm durante 20 min a 4°C, de cultivos crecidos a distintas D.O.₆₀₀ entre 0,8-1,2 en la transición de fase exponencial a estacionaria.

Tabla 11: Soluciones utilizadas para el análisis traduccional

Tampón Laemmli	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8)
	10% (v/v) Glicerol
	5% (v/v) β-mercaptoetanol
	2% (p/v) SDS
	0,002% (p/v) azul de bromofenol
Tampón fosfato (pH 8)	50mM K ₂ HPO ₄
	50mM KH ₂ PO ₄
Tampón de electroforesis (pH 8,3)	25mM Tris
	192mM Glicina
	0,1% (p/v) SDS
Solución de azul de Coomassie	40% (v/v) metanol
	10% (v/v) ácido acético
	0,25% (p/v) de azul de Coomassie
Tampón de transferencia (pH 8,3)	25mM Tris
	192 mM Glicina
Tampón TBS	50mM Tris-HCl (pH 7,4)
	200mM NaCl

Tras la centrifugación se obtuvieron tanto las proteínas totales, a partir del sedimento para su valoración por el método de Bradford, como las proteínas extracelulares, que se precipitaron a partir del sobrenadante, atendiendo al siguiente protocolo: ácido deoxicólico 10% (p/v) 10 min a temperatura ambiente, ácido tricloroacético 10% (p/v) 2 h a 4°C, y dos lavados con acetona fría 80% (v/v) centrifugando a 12.000 rpm 20 min a 4°C. El sedimento, que contenía las proteínas extracelulares, se resuspendió en tampón fosfato (tabla 11), al que se le añadieron 50 µL de un cóctel inhibidor de proteasas por cada mL de muestra. Finalmente se mezclaron con tampón Laemmli 2X (Laemmli, 1970) en proporción 1:1 (tabla 11). Para la cuantificación, el precipitado que correspondía a las proteínas intracelulares, se resuspendió en tampón fosfato (tabla 11), y se siguió el método descrito por Bradford (1976). Se prepararon distintas diluciones, y sus respectivas réplicas, de la extracción total en un volumen de 800 µL, al que se

añadieron 200 μ L de reactivo de Bradford. Tras la incubación con el reactivo durante 12-15 min en oscuridad y a 4°C, se midieron las muestras en un biofotómetro con el método de Micro-Bradford. La concentración de proteínas se calculó con respecto a una curva patrón de distintas concentraciones conocidas de la proteína BSA (del inglés *bovine serum albumin*).

4.2.2. Electroforesis de proteínas y *Western blot*

Antes de cargarlas, las muestras se hirvieron 10 min, y se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS (SDS-PAGE), al 4% y 12% (p/v) en la zona de concentración y separación respectivamente (tabla 12), con un voltaje constante de 100 V, y sumergidos en tampón de electroforesis (tabla 11). A continuación las proteínas, por un lado se tiñeron mediante la incubación del gel durante 15 min en solución azul de Coomassie (tabla 11), y por otro se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, durante 1 h a 4°C y a 100 V en tampón de transferencia (tabla 11). Tras la transferencia se lavó la membrana con TBS (del inglés *Tris Buffered Saline*) (tabla 11) 10 min, se bloqueó 1 h con leche desnatada al 2% (p/v) en TBS y se incubó 16 h a 4°C con una dilución 1:10.000 del antisuero anti-flagelina (de Weger y col., 1987) en leche desnatada al 2% (p/v) en TBS.

Tabla 12: Composición de los geles desnaturalizantes de poliacrilamida

Gel	Compuestos	Volumen (mL)
de separación (12% poliacrilamida)	Tampón Tris-HCl 1,5M pH8,8	5
	Acrilamida/bis-acrilamida 30% (p/v)	8
	SDS 10%	0,2
	N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED)	0,01
	Persulfato Amónico (APS) 10% (p/v)	0,1
	H ₂ O	6,7
de concentración (4% poliacrilamida)	Tampón Tris-HCl 0,5M pH6,8	2,5
	Acrilamida/bis-acrilamida 30% (p/v)	1,3
	SDS 10%	0,1
	N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED)	0,01
	Persulfato Amónico (APS) 10% (p/v)	0,05
	H ₂ O	1,25

Posteriormente se lavó con TBS y se incubó con el anticuerpo secundario α -IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano, en una dilución 1:10.000 en leche

desnatada al 2% (p/v) en TBS, 1 h a 4°C para su detección por quimioluminiscencia y se reveló siguiendo el protocolo de ECL™ Western Blotting Systems (GE Healthcare España S.A., Madrid, España), en el sistema de documentación de geles con quimioluminiscencia.

5. Microscopía Confocal

La construcción *pflgZ-eCFP* clonada en el plásmido pVLT31 (tabla 2) se introdujo en la cepa silvestre *P. fluorescens* F113 y en los mutantes *bifA*⁻ y *wspR*⁻*sadC*⁻, por conjugación triparental. Una vez seleccionadas las colonias que habían adquirido el plásmido de interés, se crecieron durante 16 h en cultivo líquido de medio SA, y se indujeron durante 2 h con IPTG a una concentración final 1 mM, a 28°C en agitación, para promover la síntesis de la proteína fluorescente unida a la proteína FlgZ ya que la expresión de la proteína de fusión se encuentra bajo el control de un promotor *P_{tac}*. Por último, estas construcciones fueron observadas en el Microscopio Confocal Espectral Leica TCS SP5, con un objetivo 63X y una excitación con un láser de argón a 458 nm.

6. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS. En muestras cuyas variables toman valores continuos, que siguen una distribución normal, se realizó el análisis estadístico por comparación de medias mediante el análisis de la varianza ANOVA de un factor (del inglés *Analysis Of Variance*), seguido del test de Bonferroni, en todos los casos con un nivel de significación $p < 0,05$.

Resultados

1. Tres rutas de señalización reprimen de manera independiente la movilidad en *P. fluorescens* F113

1.1. Aislamiento de mutantes por transposición implicados en la represión de la movilidad tipo *swimming*

Para poder identificar genes represores de la movilidad, se introdujeron en *P. fluorescens* F113, los transposones Tn5*luxAB* (Wolk y col., 1991) y miniTn5*gusA* (Wilson y col., 1995), ambos con un origen de replicación funcional en *E. coli*. En total se analizaron por duplicado 3.000 mutantes, seleccionándose aquéllos que presentaban halos de movilidad tipo *swimming* mayores a los de la cepa silvestre. Los mutantes de interés fueron ensayados de nuevo para poder cuantificar individualmente su halo de movilidad tipo *swimming* y se observó su capacidad de producir exoproteasa y pioverdina en condiciones no deficientes de hierro, para discriminar aquéllos que estuviesen afectados en los genes *gacAS* (sistema que regula el metabolismo secundario y que además había sido previamente descrito como represor de la movilidad en esta cepa (Martínez-Granero y col., 2006)). Además, estos mutantes hipermóviles se sometieron a la comprobación mediante la técnica de *Southern blot*, para verificar que presentaban una única copia del transposón insertada en su genoma.

Se seleccionaron veintiún mutantes que mostraban halos de movilidad mayores que la cepa silvestre, no presentaban diferencias en cuanto a la tasa de crecimiento respecto a F113, no estaban afectados en metabolismo secundario y contenían una única copia del transposón insertada en su genoma. Se extrajo el ADN genómico de estos veintiún mutantes, se digirió con enzimas que no cortaban dentro del transposón, se ligaron estos fragmentos y se transformaron en *E. coli*. Los plásmidos resultantes se extrajeron y utilizaron para determinar el sitio de inserción mediante secuenciación a partir de oligonucleótidos diseñados en los extremos de los transposones (tabla 2).

Se obtuvieron secuencias para diecisiete de los mutantes, que se corresponden con inserciones en ocho genes distintos (tabla 13). Cinco de estos mutantes presentaban inserciones en genes cuyos productos codificantes tenían homología con proteínas implicadas en la transducción de señales: KinB, SadB, WspC, WspE y WspR. KinB es la proteína sensora de un sistema de dos componentes implicado en la regulación de la producción del polisacárido alginato (Ma y col., 1997).

Tabla 13: Mutantes hipermóviles aislados

Mutante	Identificación	Posible función
LA154	SadB	Transducción de señales
LA157	KinB	Transducción de señales
LA163	familia DUF1329	Desconocida
GC282	Pfl_2797	Amidohidrolasa 2
GN286	Proteína de la familia LysR	Regulador transcripcional
GN513	WspR	Transducción de señales
GN603	WspE	Transducción de señales
GN777	WspC	Transducción de señales

Por otra parte, SadB es una proteína necesaria para las primeras etapas de la formación de biopelículas (Caiazza y O'Toole, 2004), e implicada en la movilidad tipo *swarming* (Caiazza y col., 2005), que contiene un dominio en el extremo N-terminal tipo Yba, de función desconocida, seguido de un dominio HD-GYP modificado (HN), típico de fosfodiesterasas, que llevan a cabo la hidrólisis del di-GMPc. Estos mismos fenotipos parecen estar regulados también por el sistema Wsp, cuyo efector WspR, presenta actividad diguanilato ciclasa con capacidad de sintetizar di-GMPc (Hickman y col., 2005). El hecho de que SadB y WspR se relacionasen con este importante segundo mensajero, y que no se hubiesen descrito previamente como implicados en la regulación de la movilidad tipo *swimming* en *Pseudomonas*, nos llevó a seleccionar a estos dos mutantes para estudios posteriores.

1.2. Caracterización fenotípica de los mutantes *sadB* y *wspR*

Para poder asegurar que el fenotipo de movilidad de estos mutantes se debía a la inserción del transposón, se procedió a la reconstrucción de ambos mediante mutagénesis dirigida por recombinación homóloga, provocando una interrupción por inserción de un vector suicida en el gen diana. Estos mutantes reconstruidos mostraron el mismo fenotipo hipermóvil que aquéllos que portaban el transposón (figura 8). La cepa silvestre F113 presentaba un halo de movilidad de $10,25 \pm 0,25$ mm de diámetro tras 18 h de su inoculación en las placas. Por su parte, los mutantes *gacS*⁻, *sadB*⁻ y *wspR*⁻ mostraban halos de $13,25 \pm 0,5$ mm, $15,5 \pm 1$ mm y $16 \pm 0,8$ mm de diámetro respectivamente. En todos los casos, los mutantes presentaban halos de movilidad significativamente mayores con respecto a los de F113, sin embargo no existían

diferencias significativas entre *gacS*⁻ y *sadB*⁻ ni entre *sadB*⁻ y *wspR*⁻. Solo se observaron halos significativamente mayores en el caso del mutante *wspR*⁻ frente a *gacS*⁻ ($p < 0,05$).

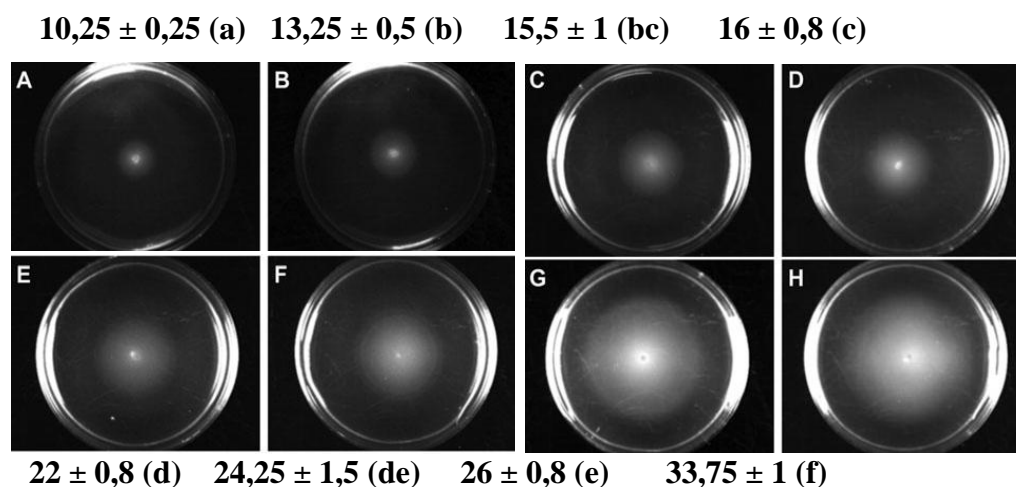


Figura 8: Movilidad tipo *swimming* de *P. fluorescens* F113 y mutantes hipermóviles. A: A. F113, B. *gacS*⁻, C. *sadB*⁻, D. *wspR*⁻, E. *gacS*⁻*sadB*⁻, F. *gacS*⁻*wspR*⁻, G. *sadB*⁻*wspR*⁻, H. *gacS*⁻*sadB*⁻*wspR*⁻. Se inocularon cultivos en fase de crecimiento exponencial en placas con medio SA con 0,3% de agar purificado. Se muestra la media y la desviación típica de los halos medidos tras 18 h. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los datos ($p < 0,05$).

Además, con estos mutantes se llevaron a cabo tanto ensayos de movilidad tipo *swarming*, como de formación de biopelículas. Al contrario de lo que ocurría en el caso de la cepa silvestre, los dos mutantes eran capaces de realizar el movimiento tipo *swarming* (figura 9) y además estaban afectados en la capacidad de formación de biopelículas en superficies abióticas (Barahona y col., 2010). Por lo tanto, además de en la movilidad tipo *swimming*, la proteína SadB y el sistema Wsp parecen estar implicados en la regulación de la movilidad tipo *swarming* y en la capacidad de formación de biopelículas en *P. fluorescens*, tal y como está descrito para otras pseudomonas (Spiers y col., 2003; Hickman y col., 2005; Ude y col., 2006; Caiazza y col., 2007; Kuchma y col., 2007).

1.3. SadB y WspR forman parte de rutas de señalización independientes

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que el sistema de dos componentes GacA/S reprimía la movilidad en *P. fluorescens* (Martínez-Granero y col., 2006). Para poder determinar si SadB y/o WspR regulaban la movilidad tipo *swimming* a través de una ruta de señalización común con el sistema Gac, se construyeron los dobles mutantes *gacS*⁻*sadB*⁻ y *gacS*⁻*wspR*⁻. Como se observa en la

figura 8, los fenotipos de *swimming* de estos dobles mutantes son aditivos con respecto a los mostrados por los mutantes simples: $22 \pm 0,8$ mm y $24,25 \pm 1,5$ mm respectivamente, indicando que ni SadB, ni WspR actúan a través de la vía en la que participa el sistema Gac. El doble mutante *sadB⁻wspR⁻* ($26 \pm 0,8$ mm) y el triple mutante *gacS⁻sadB⁻wspR⁻* ($33,75 \pm 1$ mm) también presentan un fenotipo aditivo con respecto a la movilidad tipo *swimming* (figura 8), lo que demuestra que en *P. fluorescens* F113, esta movilidad se encuentra regulada por al menos tres rutas de señalización independientes. Además, se analizó la movilidad tipo *swarming* tanto de los dobles como del triple mutante. Como se observa en la figura 9, la cepa silvestre es incapaz de realizar este tipo de movimiento en las condiciones ensayadas en el laboratorio.

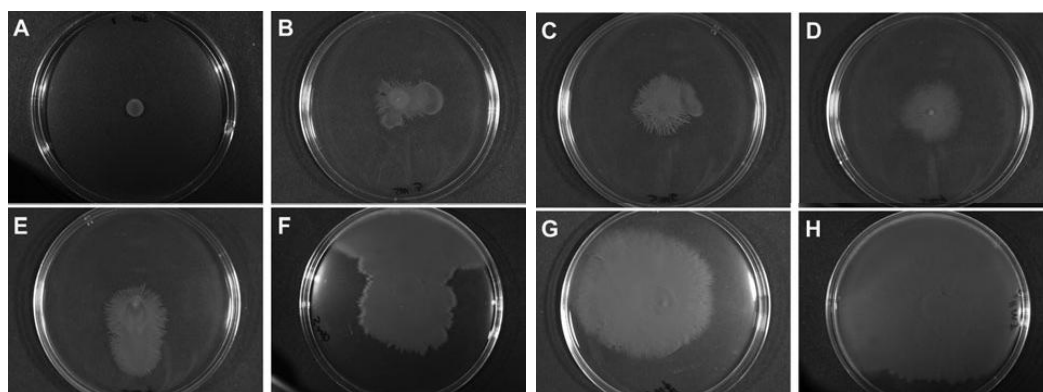


Figura 9: Movilidad tipo *swarming* de *P. fluorescens* F113 y mutantes hipermóviles. A. F113, B. *gacS⁻*, C. *sadB⁻*, D. *wspR⁻*, E. *gacS⁻sadB⁻*, F. *gacS⁻wspR⁻*, G. *sadB⁻wspR⁻*, H. *gacS⁻sadB⁻wspR⁻*. Cultivos en fase de crecimiento exponencial se inocularon en la superficie de placas con medio para *swarming* con 0,5% de agar. La movilidad se observó pasadas 14 h.

El fenotipo *swarming* del doble mutante *sadB⁻wspR⁻* es también aditivo (figura 9) indicando que la regulación de este movimiento por parte de SadB y WspR ocurre a través de rutas independientes. Por su parte, el mutante *gacS⁻* sí es capaz de realizar este movimiento y los mutantes dobles y triples en este gen presentan también un fenotipo de *swarming* aditivo. Por tanto, las mismas tres rutas que se encuentran reprimiendo la movilidad tipo *swimming*, reprimen también la movilidad tipo *swarming* de manera independiente en esta cepa.

1.4. SadB y WspR regulan la movilidad a distintos niveles

Una posible diana en la represión de la movilidad podría ser la proteína FleQ. Esta proteína actúa como regulador principal de la mayoría de los genes cuyos productos

están implicados en la síntesis del flagelo en *Pseudomonas* (Arora y col., 1997; Dasgupta y col., 2002). Por este motivo analizamos la expresión del gen *fleQ*, tanto en la cepa silvestre como en los mutantes individuales, usando una fusión transcripcional del promotor del gen *fleQ* con el gen *lacZ* carente de promotor (Redondo-Nieto y col., 2008). Como se observa en la figura 10A, los ensayos de actividad β -galactosidasa muestran un aumento en los niveles de expresión de *fleQ* en los mutantes *gacS*⁻ y *sadB*⁻, pero no en el caso del mutante *wspR*⁻.

Por su parte, el gen *fliC* codifica la proteína mayoritaria del filamento flagelar, la flagelina. Mediante un antisuero anti-flagelina pudimos detectar la cantidad de flagelina presente en la cepa silvestre y en cada uno de los mutantes. La figura 10B muestra que la cantidad de flagelina producida por el mutante *sadB*⁻ es muy alta comparándola tanto con la de la cepa silvestre como con la del resto de mutantes.

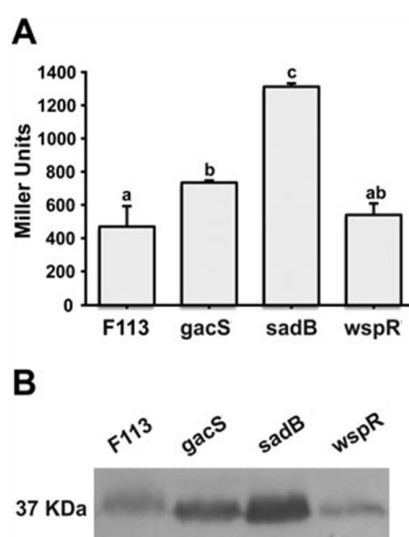


Figura 10: Producción de flagelina por parte de *P. fluorescens* F113 y mutantes hipermóviles. **A:** Expresión del gen *fleQ* en los distintos fondos genéticos. La fusión *fleQ::lacZ* se introdujo en las distintas cepas y se llevaron a cabo ensayos de actividad β -galactosidasa tres veces y por triplicado. Se muestran la media y la desviación típica de estos datos. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). **B:** Secreción de FliC (flagelina). Análisis del Western blot de las proteínas extracelulares precipitadas.

En el caso del mutante *gacS*⁻, los niveles de flagelina son mayores que los de F113, pero considerablemente menores que los del mutante *sadB*⁻. No se observan diferencias entre la cantidad de flagelina producida por la estirpe silvestre y el mutante *wspR*⁻. Así, se corrobora la existencia de una relación directa entre la expresión del gen *fleQ* y la producción de flagelina, codificada por el gen *fliC*. Estos resultados muestran que la

represión de la movilidad por parte de la proteína SadB y del sistema Gac ocurre a nivel de la síntesis de flagelo, mientras que la regulación mediada por el sistema de transducción Wsp, debe darse a otro nivel.

2. Las rutas de transducción de señales en las que están implicados los sistemas Gac-Rsm y SadB convergen a nivel de AlgU en la regulación de la movilidad en la cepa *P. fluorescens* F113

2.1. El sistema Gac regula la movilidad a través de la ruta Rsm

El análisis de la secuencia del genoma de la cepa *P. fluorescens* F113 mediante la herramienta informática BLAST, muestra que esta bacteria presenta genes que codifican tres proteínas Rsm (*rsmA*, *E* e *I*), y tres ARNs de pequeño tamaño (*rsmX*, *Y* y *Z*), homólogos a los descritos en otras pseudomonas. Al haberse observado que en la mayoría de los casos, tanto las proteínas Rsm como los ARNs reguladores *rsm* son redundantes, decidimos analizar la sobreexpresión de *rsmA* y *E*, y *rsmZ* en esta cepa. Si la represión de la movilidad se realizaba a través de la ruta Rsm, la sobreexpresión de cualquiera de estas proteínas debía mimetizar el fenotipo de los mutantes *gac*⁻. Como se observa en la figura 11, la sobreexpresión de cualquiera de los genes *rsmA* o *rsmE* en F113, produce un incremento en la movilidad comparado con la cepa silvestre, el mismo fenotipo que presentan los mutantes *gacA*⁻ y *gacS*⁻. (Martínez-Granero, 2006).

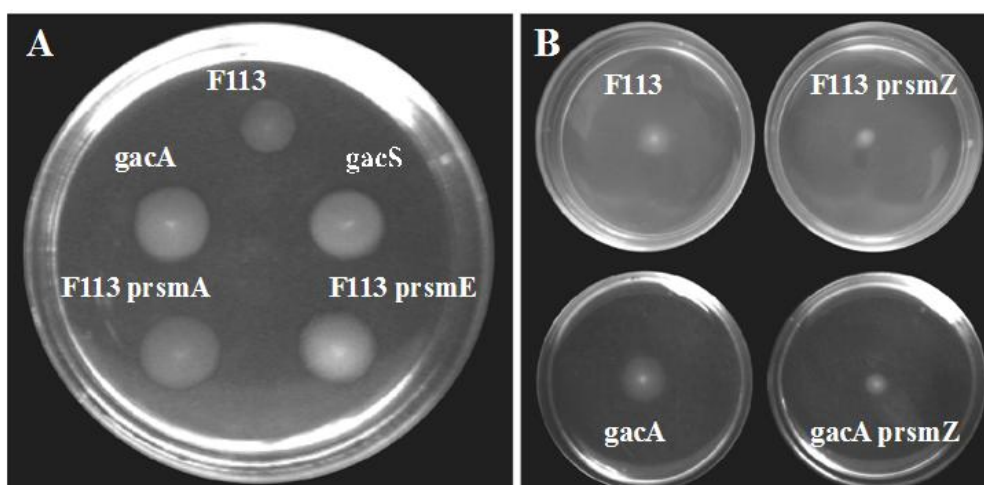


Figura 11: El sistema Gac regula la movilidad a través de la ruta Rsm. **A:** Análisis de la movilidad tipo *swimming* de *P. fluorescens* F113, *gacA*⁻, *gacS*⁻, F113 *prsmA* y F113 *prsmE* (Martínez-Granero, 2006). **B:** Movilidad tipo *swimming* de F113 y el mutante *gacA*⁻ con el vector vacío pVLT31 o *prsmZ*.

Por su parte, la sobreexpresión del ARN de *rsmZ* (F113 *prsmZ*), generando un plásmido de expresión recombinante del mismo modo que en el caso anterior, provoca una reducción de la movilidad en la cepa silvestre y la supresión del fenotipo de *swimming* en el mutante *gacA*⁻ (*gacA prsmZ*) (figura 11), confirmando que los sistemas Gac y Rsm actúan en la misma ruta de represión de la movilidad en *P. fluorescens* F113.

2.2. La regulación de *fleQ* mediada por el sistema Gac es independiente de Vfr, pero depende de AmrZ y AlgU

La regulación Gac a través de la ruta Rsm tiene lugar a nivel traduccional, ya que las proteínas RsmA y E se unen a ARNm específicos bloqueando su traducción (Blumer y col., 1999; Reimann y col., 2005). Como lo que se produce es una represión de la movilidad, el ARNm bloqueado podría codificar un represor de la transcripción de *fleQ*. Aunque se ha descrito que varias proteínas como MorA, FleN y AlgU (también llamado AlgT o σ^{22}), controlan la expresión de *fleQ* en distintas especies de *Pseudomonas* (Dasgupta y Ramphal, 2001; Choy y col., 2004; Tart y col., 2005), en *P. aeruginosa* se ha observado un papel directo en la represión de la transcripción de este gen, por unión a su región promotora, de dos proteínas: Vfr (Dasgupta y col., 2002) y AmrZ (Tart y col., 2006). Además, también en esta especie, Vfr participa en la regulación de dos caracteres controlados por el sistema Gac: la producción de elastasa y piocianina (Beatson y col., 2002). Como la región promotora de *fleQ* en F113 contiene un posible sitio de unión para Vfr, se llevó a cabo un ensayo para detectar si Vfr estaba implicado en la regulación de *fleQ* mediada por el sistema Gac. Para ello, se realizó una mutagénesis dirigida, provocando una interrupción en el gen *vfr*, por inserción del vector suicida pVIK107 que portaba un fragmento interno de dicho gen. Esta construcción se integró en el genoma de F113 por recombinación homóloga, y los mutantes *vfr*⁻ fueron comprobados mediante las técnicas de PCR y *Southern blot*. Sin embargo, el mutante *vfr*⁻ no presentó diferencias significativas en movilidad comparado con la cepa silvestre (figura 12A), indicando que Vfr no está implicado en esta ruta. Para generar el mutante *amrZ*⁻, se llevó a cabo el mismo procedimiento. El plásmido resultante, que en este caso llevaba un fragmento interno del gen *amrZ*, se introdujo en el genoma de F113 por recombinación homóloga y se comprobó la interrupción del gen mediante *Southern blot*.

Como se observa en la figura 12A, el mutante *amrZ* presenta una movilidad mucho mayor con respecto a la cepa silvestre (más de 3 veces superior), y a los mutantes *gac*⁻. Además, la introducción de un plásmido portador del gen *amrZ* complementaba el fenotipo del mutante, restableciendo el patrón de movilidad de la cepa silvestre, e indicando por tanto que AmrZ juega un importante papel en la represión de la movilidad tipo *swimming* en *P. fluorescens*. También la expresión de los genes flagelares *fleQ* y *fliC* es mayor en un mutante *amrZ* que en F113 (figura 12B y 12C).

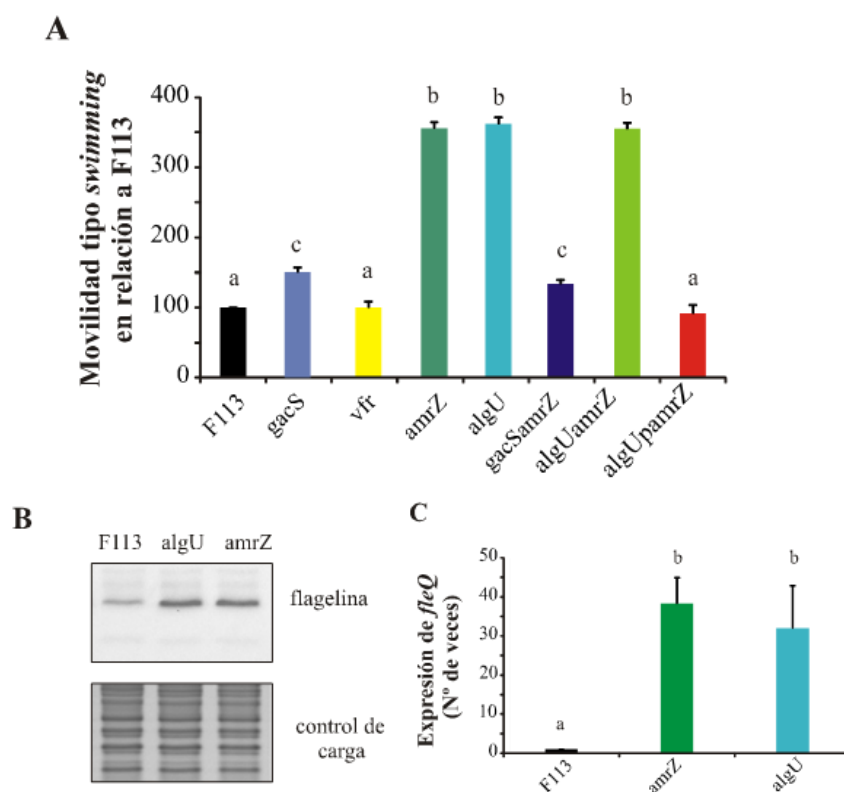


Figura 12: La represión de *fleQ* mediada por el sistema Gac es independiente de Vfr pero depende de AmrZ y AlgU. **A:** Análisis de la movilidad tipo *swimming* de F113, y los mutantes de la cascada Gac-AlgU, y su complementación con *amrZ* (*pamrZ*). **B:** Análisis de *Western blot* de las proteínas extracelulares precipitadas de F113 y los mutantes *amrZ* y *algU*, utilizando un antisuero anti-flagelina. **C:** Análisis de la expresión mediante qRT-PCR del gen *fleQ*, en F113, *amrZ* y *algU*. La expresión del gen *16S* se utilizó como control para normalizar los datos. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Para saber si AmrZ y el sistema Gac se encontraban implicados en la misma ruta de señalización, se construyó el doble mutante *gacS⁻amrZ* por interrupción del gen *gacS* en un mutante *amrZ* (tabla 1). El doble mutante presenta el mismo fenotipo de movilidad que un mutante *gacS⁻* (figura 12A), por lo que podemos afirmar que ambos genes participan en la misma ruta de regulación. Como AlgU se encuentra implicado en la regulación de la movilidad en otras pseudomonas, y se ha descrito como un factor

sigma necesario para la expresión de *amrZ*, construimos un mutante *algU* por interrupción, clonando un fragmento interno del gen en un vector suicida. El plásmido resultante se integró en el genoma de F113 por recombinación homóloga y se comprobó la interrupción mediante *Southern blot*. El mutante *algU* muestra un fenotipo de *swimming* similar al del mutante *amrZ* (figura 12A) y también presenta aumentada la expresión de los genes *fleQ* y *fliC* (figura 12B y 12C).

Para saber si AmrZ y AlgU se encontraban implicados en la misma ruta de señalización, se construyó el doble mutante *algUamrZ* por interrupción del gen *algU* en un mutante *amrZ* (tabla 1). El doble mutante *algUamrZ* muestra el mismo fenotipo de movilidad que cualquiera de los mutantes simples (figura 12A), indicando que ambos genes están actuando en la misma ruta de señalización. Además, la expresión ectópica de *amrZ* en el mutante *algU* (*algU pamrZ*), restablece la movilidad de la cepa silvestre (figura 12A), demostrando que el fenotipo del mutante *algU* es consecuencia de que *amrZ* no está expresándose.

2.3. RsmA se une al ARNm policistrónico de *algUmucAB*

En *P. fluorescens* F113, el gen *algU* se localiza corriente arriba de dos genes que codifican los factores antisigma MucA y MucB. Para poder determinar si estos tres genes se encuentran formando un único operón, se realizó una amplificación mediante RT-PCR de ADNc sintetizado a partir del ARN extraído de la cepa silvestre. Para ello se diseñaron oligonucleótidos que permitieran la co-amplificación de fragmentos compuestos por partes de genes adyacentes (tabla 2). Como se observa en la figura 13A se obtuvieron fragmentos del tamaño esperado para *algU-mucA* y *mucA-mucB*, indicando que estos tres genes se encuentran codificados en un único ARNm policistrónico.

También se llevó a cabo un ensayo de inmunoprecipitación de ARN para determinar si la proteína RsmA se unía a este ARNm. Para ello, se generó una proteína RsmA marcada con el péptido HA en el extremo C-terminal, se clonó en el vector pVLT31 (tabla 1), y se comprobó que la proteína RsmA-HA era funcional ya que, al introducir el plásmido recombinante (*prsmA-HA*) en los distintos mutantes, mimetizaba el fenotipo de sobreexpresión del gen *rsmA*.

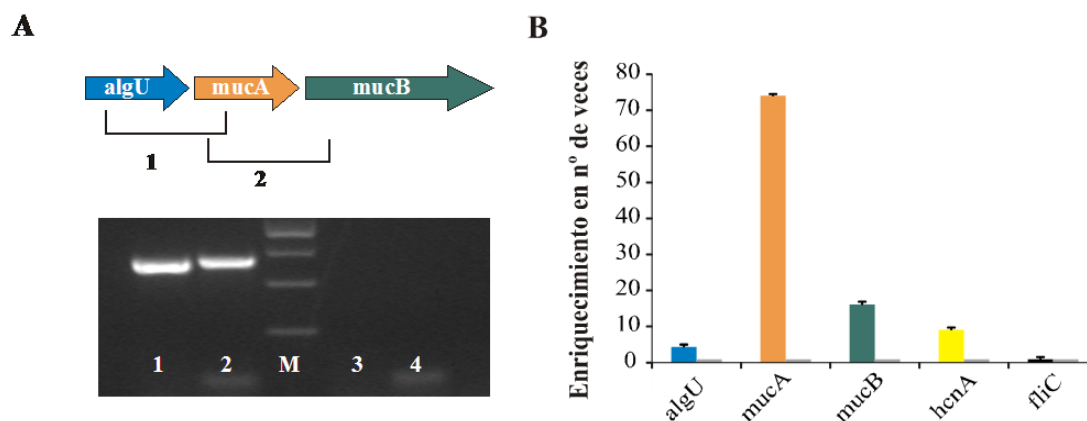


Figura 13: RsmA se une al ARNm policistrónico de *algUmucAB*. **A:** RT-PCR de genes adyacentes en el ARNm policistrónico *algU-mucA-mucB*. RT-PCR de ADNc usando los cebadores: qalgUF-mucAR (calle 1) y qmucAF-qmucBR (2); y PCR de ARN con los mismos oligonucleótidos: qalgUF-mucAR (3) y qmucAF-qmucBR (4). **B:** Ensayo de inmunoprecipitación de ARN de F113 portando el plásmido *prsmAHA*. qRT-PCR del ARN inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-HA (barra de color) e inmunoprecipitado con el anticuerpo control IgG (barra gris), usando los cebadores qalgUF-R (*algU*), qmucAF-R (*mucA*), qmucBF-R (*mucB*), qhcnAF-R (*hcnA*) y qfliCF-R (*fliC*). El gen *fliC* se utilizó como control para normalizar los datos.

El ensayo de inmunoprecipitación del ARN (figura 13B) muestra que la proteína RsmA se une al ARNm policistrónico *algUmucAB*. Además, la unión de RsmA a este ARNm es más fuerte que al ARNm de *hcnA*, descrito previamente como un ARN regulado post-transcripcionalmente por la unión de RsmA a su región 5' (Lapouge y col. 2007; Schubert y col., 2007). La unión de RsmA parece estar localizada en la región situada corriente arriba de *mucA*, ya que la mayor cantidad de ARN precipitado se corresponde con esta región.

2.4. SadB y GacAS regulan la expresión de *algU*

Como se ha descrito en el apartado 1.4 (figura 10), el sistema GacA/S y la proteína SadB reprimen la movilidad en la cepa *P. fluorescens* F113 a través de *fleQ* (Navazo y col., 2009). Para dilucidar si la regulación de *fleQ* por parte de la proteína SadB también se llevaba a cabo a través de la ruta de AlgU-AmrZ se construyeron los dobles mutantes *algU sadB*⁻ y *amrZ sadB*⁻ (tabla 1). Como se observa en la figura 14A, ambos dobles mutantes presentan el mismo fenotipo de movilidad que el mutante *sadB*⁻, indicando así que los tres genes se encuentran formando parte de una única ruta de regulación.

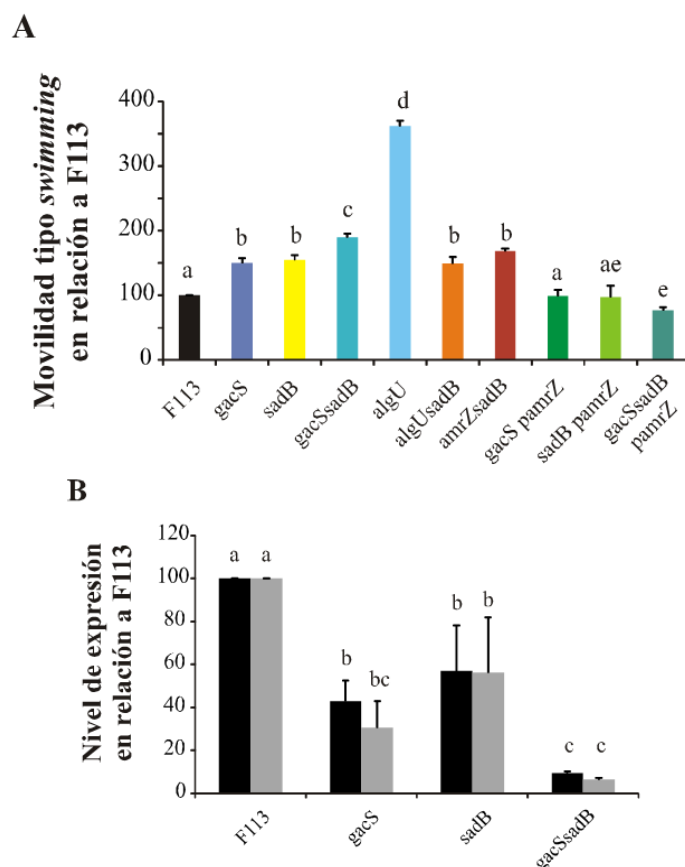


Figura 14: SadB y GacAS regulan la expresión de *algU*. **A:** Análisis de la movilidad tipo *swimming* de F113, mutantes en la cascada definida por Gac-SadB-AlgU, y complementados con la expresión del gen *amrZ* (*pamrZ*). **B:** Análisis de la expresión obtenida mediante qRT-PCR de los genes *algU* (barra negra) y *amrZ* (barra gris) con los oligonucleótidos *qalgUF-R* y *qamrZF-R* respectivamente; en F113, *gacS*, *sadB* y el doble mutante *gacS**sadB*. La expresión del gen *16S* (*16SF-R*) se utilizó para normalizar los datos. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Por otra parte, ya se ha explicado en el apartado 1.3 que el doble mutante *gacS**sadB* mostraba un fenotipo de movilidad tipo *swimming* aditivo (figura 8) con respecto al de los mutantes simples (Navazo y col., 2009), por tanto, las rutas en las que están implicados la proteína SadB y el sistema Gac convergen a nivel de la regulación de *algU*. Además al analizar la expresión de *algU* y *amrZ* en los distintos mutantes: *gacS*, *sadB* y *gacS**sadB*, encontramos que la expresión de ambos genes se encuentra claramente reducida en los mutantes individuales, siendo prácticamente inexistente en el caso del doble mutante (figura 14B). De este modo se confirma que existe una regulación cooperativa de las rutas en las que participan los sistemas Gac y la proteína SadB sobre *algU*. Además, la expresión ectópica de *amrZ* en los mutantes *gacS*, *sadB* y *gacS**sadB*, mediante la introducción del plásmido *pamrZ*, complementa sus fenotipos de movilidad (figura 14A).

3. FlgZ integra las señales de los sistemas independientes Wsp y SadC/BifA en la cepa *P. fluorescens* F113

3.1. *flgZ* es un gen flagelar

El gen *flgZ* se encuentra localizado corriente abajo de los genes *flgAMN*, en el mismo sentido de la transcripción en el genoma de *P. fluorescens* F113 y está conservado en cuanto a secuencia y sintenia en los genomas de todas las *Pseudomonas* secuenciadas. Este gen codifica una proteína con un dominio PilZ altamente conservado en el extremo C-terminal (pfam 07238) y un dominio tipo YcgR menos conservado en el N-terminal (pfam 07317) (figura 15), que en conjunto muestra cierta homología con la proteína YcgR de enterobacterias, descrita recientemente como una proteína que regula la movilidad, actuando como un freno del motor flagelar en respuesta a los niveles de di-GMPc sintetizados por determinadas proteínas con actividad diguanilato ciclasa (Boehm y col., 2010; Paul y col., 2010).

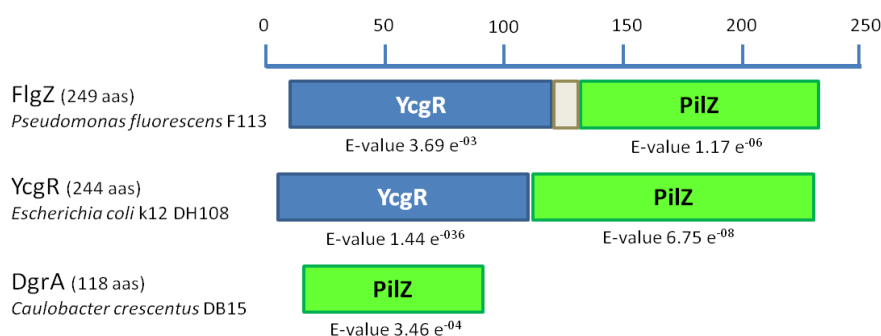


Figura 15: Esquema de los dominios conservados y su homología correspondiente, presentes en tres proteínas con dominios PilZ en distintas especies: FlgZ de *P. fluorescens* F113, YcgR de *E. coli* k12 DH108 y DgrA de *Caulobacter crescentus* DB15.

El dominio PilZ de FlgZ muestra también homología con un dominio similar presente en la proteína DgrA de *C. crescentus*, implicada en la regulación de la movilidad tipo *swimming* (Christen y col., 2007). Para averiguar si la proteína FlgZ podría estar implicada en la regulación de la movilidad tipo *swimming* en nuestra cepa de estudio, se construyó un mutante por interrupción del gen *flgZ*. Como se observa en la figura 16, el mutante *flgZ* presenta una movilidad mayor que la estirpe silvestre. Este fenotipo de movilidad se complementa al introducir en el mutante, el gen *flgZ* clonado en el vector de expresión pVLT31. Estos resultados muestran que FlgZ regula la movilidad tipo *swimming* en la cepa *P. fluorescens* F113.

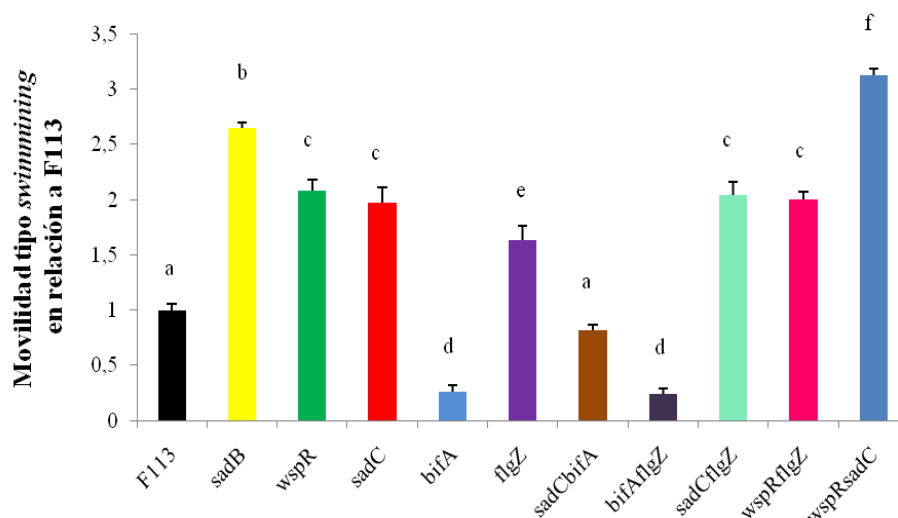


Figura 16: Movilidad tipo *swimming* de *P. fluorescens* F113 y mutantes relacionados con la síntesis y degradación del di-GMPc. Las distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por otro lado, al localizarse el gen *flgZ* contiguo a un *cluster* de genes flagelares, nos planteamos si se co-transcribiría junto con estos genes. Para ello, al igual que en el apartado 2.4, se diseñaron oligonucleótidos que permitieran la co-amplificación de fragmentos compuestos por genes adyacentes (tabla 2), obteniéndose fragmentos del tamaño esperado para *flgA-flgM*, *flgM-flgN* y *flgN-flgZ*. Por tanto, *flgZ* forma parte del mismo ARNm policistrónico que *flgA*, *flgM* y *flgN* (figura 17).

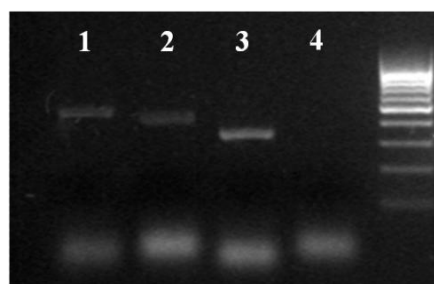


Figura 17: RT-PCR de ADNc de la región adyacente al gen *flgZ*. 1: amplificación del fragmento *flgM-flgN*; 2: amplificación del fragmento *flgN-flgZ*; 3: amplificación de un fragmento interno de *flgZ*; 4: RT-PCR de ARN de un fragmento interno de *flgZ*.

Estudios previos en *P. aeruginosa* ya habían descrito que FliA y FleQ activaban débilmente la transcripción de un operón de genes flagelares del que formaban parte *flgM* y *flgN* (Dasgupta y col., 2003). En el caso de *P. fluorescens* F113, mutantes *fliA* o *fleQ*, muestran una disminución significativa en los niveles de expresión del gen *flgZ*.

(figura 18) siendo la expresión un 55% y 76% menor respectivamente, comparado con la cepa silvestre.

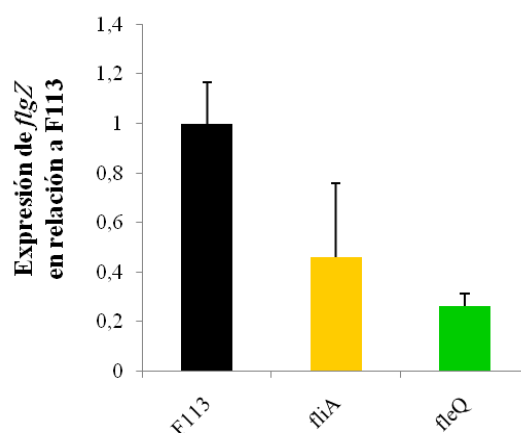


Figura 18: Análisis de la expresión de *flgZ* realizados mediante la amplificación por PCR cuantitativa de ADNc de F113, *fliA* y *fleQ*, relativos a F113. La expresión de este gen se encuentra claramente disminuida en ambos mutantes.

En conjunto, todos estos resultados indican que *flgZ* es un gen flagelar que afecta a la movilidad tipo *swimming* en *P. fluorescens* F113, cuya expresión está controlada por FliA y FleQ, del mismo modo que los genes flagelares del operón del que forma parte.

3.2. FlgZ regula la movilidad integrando la señalización vía di-GMPc de dos sistemas independientes: SadC/BifA y el sistema Wsp

En los últimos años, varios estudios realizados en distintas estirpes bacterianas han demostrado que el segundo mensajero di-GMPc es capaz de unirse a dominios tipo PilZ, provocando cambios conformacionales en la proteína a la que pertenece (Ko y Park, 2000; Ryjenkov y col., 2006; Benach y col., 2007; Ko y col., 2010). Este hecho nos llevó a analizar mutantes en genes implicados en la regulación de la movilidad, cuyos productos codificantes pudiesen participar en la síntesis y/o degradación del di-GMPc, de manera que el di-GMPc resultante podría estar regulando la movilidad vía FlgZ. Ya se ha comentado que el gen *wspR* de *P. aeruginosa* codifica una proteína con actividad diguanilato ciclasa (DGC), efectora del sistema de transducción de señales Wsp (Hickman y col., 2005). En el caso de *P. fluorescens* F113, WspR está implicada en la regulación de la movilidad mediada por flagelos (figuras 8 y 9), ya que un mutante *wspR*⁻ presenta un fenotipo hipermóvil tanto en movilidad tipo *swimming*, como *swarming* (Navazo y col., 2009). Construimos por ello un doble mutante en los genes *wspR* y *flgZ* y encontramos que mostraba el mismo fenotipo móvil que el mutante *wspR*⁻

(figura 16). Así, podemos afirmar que la mutación en *wspR* es epistática sobre *flgZ* y que ambos genes participan en la misma ruta de regulación de la movilidad. Los mismos resultados obtuvimos al ensayar con el doble mutante *sadC flgZ* (figura 16). SadC es una proteína transmembrana que presenta un dominio GGDEF con actividad DGC descrita en la regulación de la movilidad tipo *swarming* en la cepa *P. aeruginosa* (Merrit y col., 2007). En ambos casos, los dobles mutantes presentan el mismo fenotipo de movilidad que los mutantes simples *wspR*⁻ y *sadC*⁻ en cada caso. Sin embargo, un doble mutante *sadC⁻ wspR⁻* muestra un fenotipo de movilidad aditivo, indicando que estos dos genes contribuyen de manera independiente a la regulación de la movilidad mediada a través de FlgZ (figura 16).

Por otro lado, Kuchma y col. (2007) describieron en *P. aeruginosa* una proteína, BifA, con dominios GGDEF y EAL, pero únicamente con actividad fosfodiesterasa (PDE), que parecía formar un único sistema de síntesis y degradación del di-GMPc junto con la proteína SadC (Merrit y col., 2007). En *P. fluorescens* F113 observamos que el mutante *bifA*⁻ se encuentra claramente afectado en cuanto a la movilidad tipo *swimming* se refiere, mientras que el doble mutante *sadC⁻ bifA⁻* presenta el mismo fenotipo móvil que la estirpe silvestre (figura 16). Para saber si esta proteína con actividad PDE, capaz de degradar el di-GMPc sintetizado por SadC, estaba implicada en la ruta de regulación mediada por FlgZ, construimos el doble mutante *bifA⁻ flgZ*. Este doble mutante presenta el fenotipo de movilidad correspondiente al del mutante simple *bifA*⁻, observándose el mismo fenómeno de epistasia sobre *flgZ*,

Todos estos resultados indican que FlgZ regula la movilidad tipo *swimming* en una ruta que implica tanto a las proteínas con actividad DGC WspR y SadC, como a la enzima con actividad PDE BifA, vía detección de los niveles del segundo mensajero di-GMPc.

3.3. FlgZ regula la movilidad de manera independiente a las rutas en las que están implicados el sistema Gac y la proteína SadB

En apartados anteriores, ya se ha explicado como las rutas en las que están implicados los sistemas GacA/GacS, Wsp y la proteína SadB regulan la movilidad de forma independiente. En concreto, el sistema GacA/GacS y la proteína SadB reprimen la síntesis de los componentes del aparato flagelar, incluyendo la proteína mayoritaria, la flagelina (FliC) (Navazo y col., 2009), a través de la regulación de *algU* (Martínez-Granero y col., en revisión). Para averiguar si la regulación de la movilidad vía FlgZ

podría estar vinculada con cualquiera de estas dos rutas, se llevó a cabo la construcción de los dobles mutantes *gacS*⁻*flgZ*⁻, *sadB*⁻*sadC*⁻ y *sadB*⁻*bifA*⁻.

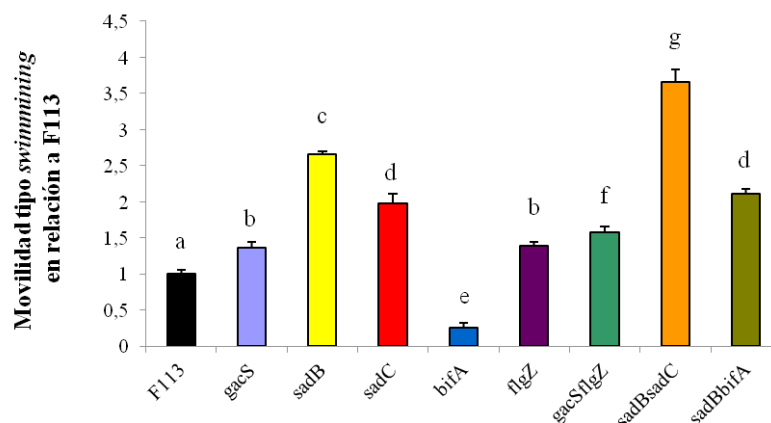


Figura 19: Movilidad tipo *swimming* de *P. fluorescens* F113 y mutantes en genes de las rutas mediadas por FlgZ, el sistema Gac y la proteína SadB. Las distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El fenotipo de movilidad de los dobles mutantes *gacS*⁻*flgZ*⁻ y *sadB*⁻*sadC*⁻ es mayor que el de cualquiera de los mutantes simples, mientras que *sadB*⁻*bifA*⁻ muestra una movilidad intermedia entre la observada por los mutantes simples por separado, pero superior a la de la estirpe silvestre (figura 19), indicando que la ruta de regulación de la movilidad mediada por FlgZ es independiente de las rutas en las que participan el sistema Gac y la proteína SadB.

3.4. FlgZ cumple un papel clave en la formación de biopelículas

Debido a que todos estos mutantes parecían estar implicados de alguna manera en el metabolismo o en la captación del segundo mensajero di-GMPc, decidimos comprobar también su capacidad de formación de biopelículas (figura 20). Los dos mutantes en genes que codifican proteínas con actividad DGC, tanto el mutante *wspR*⁻, que ya había sido descrito en trabajos anteriores de nuestro grupo como un mutante afectado en la formación de biopelículas (Barahona y col., 2010); como el mutante *sadC*⁻, presentan una menor capacidad de adherirse al sustrato que la estirpe silvestre; mientras que el mutante *bifA*⁻, cuyo producto es una proteína con actividad PDE, muestra una capacidad de adhesión mucho mayor que F113 (figura 20).

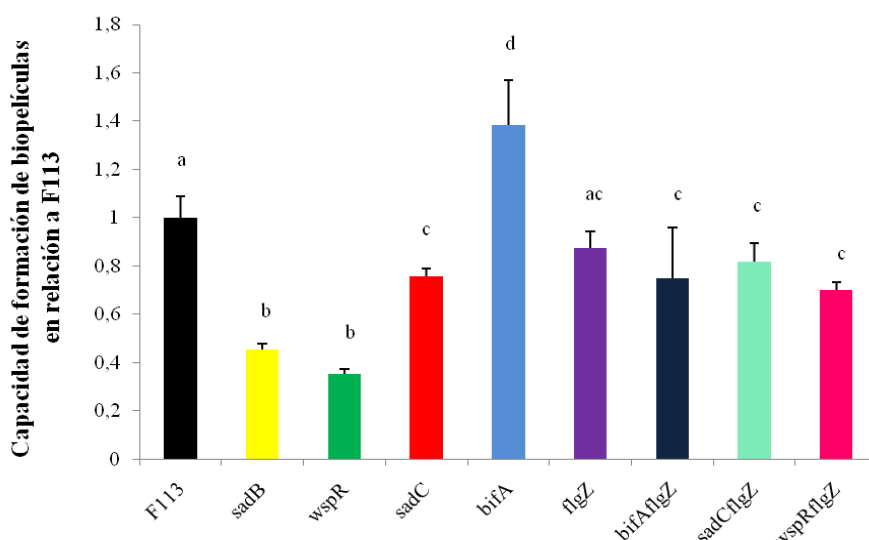


Figura 20: Capacidad de formación de biopelículas de *P. fluorescens* F113 y mutantes relacionados con la síntesis y degradación del di-GMPc, realizado en placas multipocillo. Las distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el caso del mutante *flgZ*, no se observan diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre aunque sí parece apreciarse una disminución en la capacidad de adhesión. Sin embargo, cuando observamos el fenotipo de adhesión de cualquiera de los dobles mutantes con *flgZ*, observamos que en todos los casos el fenotipo del mutante *flgZ* es epistático sobre cualquiera que sea el otro gen que se encuentre mutado (figura 20), es decir independientemente de los niveles de di-GMPc presentes en la célula. Este hecho parece indicar que la proteína FlgZ tiene un papel clave en la transición de los estilos de vida de móvil a sésil en la cepa *P. fluorescens* F113.

3.5. FlgZ se localiza en uno de los polos de la bacteria, en la base del flagelo

En otras estirpes bacterianas se ha descrito recientemente cómo el homólogo a FlgZ en enterobacterias, YcgR, se sitúa en la base del motor del flagelo, co-localizando con proteínas que forman parte del rotor, donde parece llevar a cabo su función de freno del motor del flagelo por interacción física con las proteínas allí localizadas (Boehm y col., 2010; Paul y col., 2010). Teniendo en cuenta que en *P. fluorescens* F113 esta proteína interviene en la represión de la movilidad, y que podría tener una función similar como freno del motor flagelar en relación con los niveles de di-GMPc, decidimos comprobar si FlgZ se localizaba en uno de los polos celulares. Para ello, se generó una proteína de fusión FlgZ-eCFP, que se clonó en el vector de expresión pVLT31. Este plásmido se introdujo en la cepa *P. fluorescens* F113, en el mutante *bifA*⁻ y en el doble mutante

wspR⁻sadC⁻, por conjugación triparental y las colonias resultantes se observaron mediante microscopía confocal. En la figura 21 se puede apreciar cómo tanto en la cepa silvestre F113, y más claramente en el mutante *bifA⁻*, la proteína FlgZ se sitúa en uno de los polos de la bacteria. Sin embargo, en el caso del doble mutante *wspR⁻sadC⁻*, esta proteína marcada no se localiza en los polos, sino que el marcaje aparece de manera más difusa en el citoplasma celular.

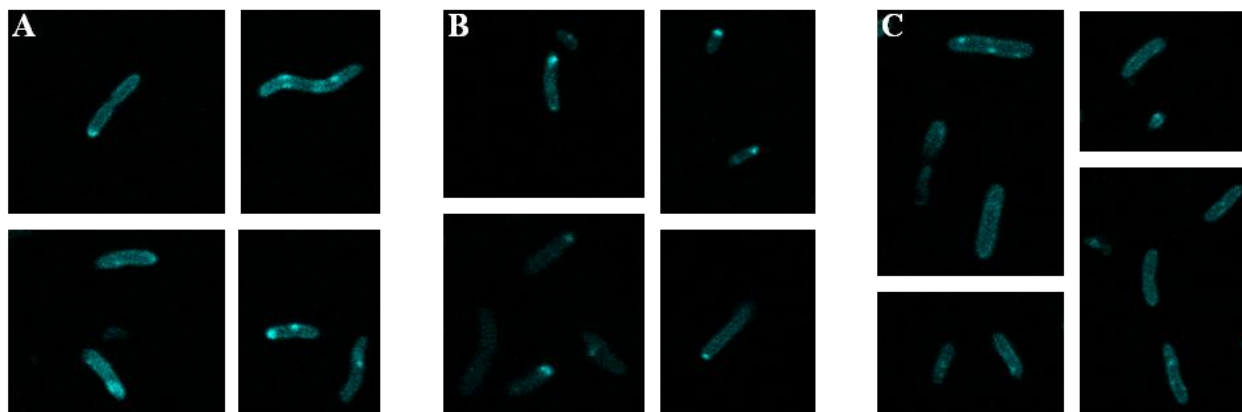


Figura 21: Imagen de microscopía confocal de la localización de FlgZ-eCFP en *P. fluorescens* F113 y derivados. A: *P. fluorescens* F113. B: Mutante *bifA⁻*. C: Doble mutante *wspR⁻sadC⁻*.

Por tanto, en mutantes en genes que codifican proteínas con actividad DGC, la proteína FlgZ se encuentra distribuida de manera difusa en el citoplasma celular, mientras que en la cepa silvestre F113 y en un mutante en un gen que codifica una proteína con actividad PDE, la proteína FlgZ se localiza en el polo donde se encuentra localizado el flagelo en *P. fluorescens* F113.

Discusión

1. La mutación de varios genes que codifican proteínas implicadas en la transducción de señales provoca fenotipos de hipermovilidad.

Considerando que la movilidad se ha descrito como uno de los factores más importantes que intervienen para que se lleve a cabo una colonización competitiva de la rizosfera (de Weert y col., 2002; Capdevila y col., 2004), se realizó una mutagénesis al azar por inserción de transposones derivados de Tn5, con el objeto de identificar y analizar las diferentes rutas implicadas en su regulación. Tras el análisis de tres mil mutantes, veintiuno de ellos (0,7%) mostraron su fenotipo de movilidad tipo *swimming* incrementado con respecto a la cepa silvestre y no presentaron alteraciones en la producción de metabolitos secundarios. Estos mutantes producían exoproteasa en un medio específico, pero no sobreproducción de pioverdina en medio LB, fenotipos característicos de mutantes en el sistema *gac* en F113 (Martínez-Granero y col., 2005). En total, de entre los que presentaron mayor capacidad de movimiento conseguimos identificar siete genes distintos que habían sido interrumpidos por inserciones del transposón (Tabla 13).

Tres de ellos, *wspC*, *wspE* y *wspR*, constituyen un único operón, compuesto por siete genes, cuyos productos presentan homología con los sistemas Che de quimiotaxis de *E. coli*, y más concretamente con el *cluster* III de *P. aeruginosa*, formado por el operón *wsp* (Ferrández y col., 2002). En este sistema, WspA es la proteína integral de membrana, responsable de la percepción del estímulo, con homología a las MCP de *E. coli*. El estado de activación de esta proteína está controlado por WspD y WspF, con actividad metiltransferasa y metilesterasa respectivamente, que devuelven a WspA a su estado inactivo. La proteína WspA se encuentra formando un complejo junto con otras tres proteínas, WspB, WspD y WspE. WspB y D actuarían como adaptadores transmisores de la señal, del mismo modo que CheW, mientras que WspE, con actividad quinasa, es homóloga a CheA. La metilación de WspA provoca la activación de WspE, que se autofosforila y transfiere el grupo fosfato a WspR, la proteína efectora del sistema. WspR presenta un dominio receptor homólogo a CheY en N-terminal, que se fosforila tras la acción de WspE, y otro efector GGDEF (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe), en C-terminal (Bantinaki y col., 2007). Este tipo de dominios se encuentran asociados al metabolismo de un segundo mensajero muy importante en bacterias, el di-GMPc, cuyos niveles dentro de la célula están enzimáticamente controlados por proteínas con actividad diguanilato ciclasa (DGC), asociada a dominios GGDEF (Paul y col., 2004), y

fosfodiesterasa (PDE), asociada a dominios EAL (Glu-Ala-Leu) (Christen y col., 2005; Tamayo y col., 2005) y HD-GYP (His-Asp//Gly-Tyr-Pro) (Ryan y col., 2006). Se ha demostrado que el dominio GGDEF es funcional en la proteína WspR, tanto en *P. aeruginosa* PAO1, como en *P. fluorescens* SBW25, ya que es capaz de sintetizar di-GMPc (Hickman y col., 2005; Malone y col., 2007). El sistema Wsp se encuentra implicado en la acetilación, durante el proceso de síntesis de celulosa (Spiers y col., 2003; Ude y col., 2006), en la formación de colonias con fenotipo *wrinkly spreader* (Spiers y col., 2003; Goymer y col., 2006; Bantinaki y col., 2007), en la síntesis de exopolisacárido (D'Argenio y col., 2002; Hickman y col., 2005), en adhesión y formación de biopelículas (Spiers y col., 2003; Hickman y col., 2005; Ude y col., 2006) y en la represión de la movilidad tipo *swarming* (Hickman y col., 2005). En *P. aeruginosa* PAO1, se ha encontrado una relación inversa entre la movilidad dependiente de flagelos y la síntesis de exopolisacárido (EPS), mediada por los niveles de di-GMPc. En esta cepa, se ha demostrado que este segundo mensajero es capaz de unirse directamente a la proteína FleQ, provocando un cambio conformacional que impide su interacción con el promotor del operón de los genes *pel*, implicados en la síntesis de EPS. Este hecho se traduce por un lado, en el aumento de la síntesis de EPS, y por otro, en la represión de la biosíntesis del flagelo. Estos estudios, realizados con un mutante en el sistema Wsp, *wspF*⁻, que presenta altos niveles de di-GMPc intracelular, parecen indicar que es el di-GMPc proveniente de la ruta Wsp, el que se une al regulador FleQ, ya que los mutantes en *wspF*⁻, *fleQ*⁻, y *wspF fleQ*⁻ presentan los mismos niveles de expresión de *pelA* y *pslA*, implicados en la síntesis de EPS (Hickman y Harwood, 2008). Sin embargo, a pesar de que WspR se encuentre en *P. fluorescens* F113 implicada en la regulación de la movilidad tipo *swimming* y *swarming* (Navazo y col., 2009), y en la capacidad de formación de biopelículas (Barahona y col., 2010), esta proteína no parece participar en el control de la biosíntesis del flagelo, ya que el mutante *wspR*⁻ presenta los mismos niveles tanto de *fleQ* como de flagelina que la cepa silvestre (figura 10).

Otro de los genes interrumpidos por el transposón es *sadB*. Este gen fue identificado por primera vez en un rastreo de mutantes de la cepa *P. aeruginosa* PA14 como un gen implicado en la adhesión a superficies en las fases iniciales de la formación de biopelículas (O'Toole y Kolter, 1998a; Caiazza y O'Toole, 2004). Además, se ha descrito que regula la movilidad tipo *swarming*, participando tanto en la represión como

en la inhibición por contacto en este tipo de movilidad, ya que el mutante *sadB*⁻ de esta cepa, aunque produce ramnolípidos, es incapaz de detectarlos (Caiazza y col., 2005). La proteína SadB se encuentra localizada en el citoplasma (Caiazza y O'Toole, 2004) y contiene un dominio HD-GYP. Sin embargo, no se ha demostrado actividad DGC ni PDE en la proteína SadB. Parece que su efecto en la movilidad tipo *swarming* es debido tanto a un aumento en la velocidad de rotación del flagelo en medios viscosos, como al incremento en la tasa de cambio de sentido de su rotación, que es dos veces mayor en un mutante *sadB*⁻ que en la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PA14. Su efecto en la formación de biopelículas también está relacionado con una disminución de los niveles de EPS en el mutante *sadB*⁻ (Caiazza y col., 2007).

En cuanto a las rutas de señalización en las que podría participar esta proteína, en *P. aeruginosa* PA14 se ha descrito que mutaciones en el gen *sadC* provocan un fenotipo muy similar al del mutante *sadB*⁻, disminuyendo la formación de biopelículas, aumentando su movilidad tipo *swarming* y modificando la tasa de cambio de sentido de rotación del flagelo (Merritt y col., 2007); mientras que mutantes en *bifA* presentaban el fenotipo contrario, es decir, son incapaces de realizar el movimiento tipo *swarming*, disminuyen la tasa de cambio de sentido de rotación del flagelo, y presentan aumentada su capacidad de formación de biopelículas en superficies abióticas, así como la síntesis de EPS (Kuchma y col., 2007). Ya se ha comentado que *sadC* codifica una proteína localizada en la membrana interna, que contiene un dominio GGDEF y actividad DGC, capaz de sintetizar di-GMPc (Merritt y col., 2007). Por su parte, la proteína BifA, presenta dos de estos dominios relacionados con el di-GMPc: un dominio en N-terminal tipo GGDEF modificado (GGDQF), que no tiene actividad DGC, y otro en C-terminal tipo EAL con actividad PDE (Kuchma y col., 2007). La doble mutación en los genes *sadC* y *bifA* provocan un fenotipo intermedio, restaurando parcialmente todos estos fenotipos, pero no a niveles de la cepa silvestre, por lo que sugieren que otras DGC, como WspR, podrían estar contribuyendo a la síntesis del di-GMPc degradado por BifA en condiciones normales (Merritt y col., 2007). Mutantes en *pilJ*, un gen que codifica MCPs del sistema de quimiotaxis CheIV (Ferrández y col., 2002) o *motAB*, que codifican las proteínas del estator del motor del flagelo, también estaban afectados del mismo modo que el mutante *sadB*⁻, en la tasa de cambio de sentido de rotación del flagelo en medios viscosos en esta cepa (Toutain y col., 2005; Caiazza y col., 2007). Con todos estos datos propusieron un modelo en el que los genes *sadC*, *bifA*, *sadB*,

pelA/pilJ participan en una misma ruta de transmisión de la señal (Merritt y col., 2007), donde *sadB*, se encuentra por debajo del control de SadC y BifA, detectando los niveles de di-GMPc. La regulación de la movilidad tipo *swarming* a través de SadB en esta cepa se produce a nivel del control de la función flagelar, y no de su biosíntesis, no habiéndose encontrado diferencias en cuanto a la movilidad tipo *swimming* en esta cepa.

Otro de los mutantes hipermóviles presentaba la inserción del transposón en el gen *kin*. Este gen codifica la proteína reguladora de un sistema de dos componentes implicada en la regulación de la producción del exopolisacárido alginato en *pseudomonas* (Ma y col., 1997; Damron y col., 2009). El análisis de éste mutante, nos permitió concluir que KinB está implicado en la represión de un segundo aparato flagelar codificado en el genoma de *P. fluorescens* F113 que no está presente en otras *pseudomonas*, cuyo genoma ha sido secuenciado (Barahona, 2011).

Además de estos mutantes, estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron un papel del sistema de dos componentes GacA/GacS en la regulación negativa de la movilidad en *P. fluorescens* F113 (Martínez-Granero y col., 2005; 2006). Aunque en la mayoría de las rutas estudiadas el sistema Gac actúa como un regulador positivo, determinados factores como la movilidad tipo *swarming* o la producción de ramnolípidos y lipasa, parecen estar reprimidos por la acción de este sistema (Heurlier y col., 2004). Ya se ha comentado que durante el proceso de colonización de la rizosfera, tanto en la cepa *P. brassicacearum* NFM421, como en *P. fluorescens* F113, se seleccionan variantes fenotípicos más móviles, que producen mayor cantidad de flagelina y que son además mejores colonizadores de la rizosfera en competición con la cepa silvestre (Achouak y col., 2004; Martínez-Granero y col., 2006). En el caso de *P. fluorescens* F113, se ha demostrado que estos variantes hipermóviles portan mutaciones en alguno de los genes *gac* (Martínez-Granero y col., 2006). Además, el hecho de que FliC y FliD se encuentren entre las proteínas que más aumentan su producción en los mutantes *gac*⁻ en *P. aeruginosa* (Kay y col., 2006) y *P. fluorescens* (Hassan y col., 2010), sugiere que la represión de la movilidad por el sistema Gac debe ser un rasgo general en las *pseudomonas*.

La regulación positiva a través del sistema Gac se produce de manera post-transcripcional. Una señal aún por identificar provocaría la autofosforilación del sensor

GacS (Zuber y col., 2003), que transferiría este grupo fosfato al regulador del sistema GacA, activando a su vez la transcripción de genes que codifican ARNs de pequeño tamaño, llamados *rsmX*, *Y* y *Z* (Goodman y col., 2009). Estos riborreguladores reclutan proteínas como RsmA, y E, que se encuentran unidas a ARNm específicos bloqueando su traducción (Valverde y col., 2004; Lapouge y col., 2007). Así, un sistema Gac activo, llevaría a la unión entre los ARN reguladores de pequeño tamaño y las proteínas RsmA y E, de modo que los ARNm serían traducidos. De manera inversa, en ausencia de un sistema Gac funcional, las proteínas RsmA y E podrían unirse a sus ARNm diana impidiendo su traducción (Brencic y Lory, 2009).

El estudio de todos estos mutantes y sus interacciones genéticas nos han permitido describir tres niveles en la regulación del movimiento en *P. fluorescens* F113:

- Biosíntesis del aparato flagelar típico de las pseudomonas (Flagelo 1).
- Biosíntesis del aparato flagelar atípico, presente en F113 (Flagelo 2) (Barahona, 2011).
- Funcionamiento del flagelo.

2. Regulación de la biosíntesis del Flagelo 1.

De todos los mutantes ensayados, solamente los mutantes *gac*⁻ y *sadB*⁻ presentaban afectados los niveles de expresión de los genes *fleQ* y *fliC*, que codifican el regulador principal de la síntesis del aparato flagelar y la flagelina, respectivamente. Además, la cantidad de flagelina se encontraba también incrementada en dichos mutantes. Estos resultados muestran que tanto el sistema Gac, como SadB, regulan la movilidad a través de la represión de la síntesis de componentes del filamento flagelar. Por el contrario, mutaciones en *kinB* y *wspR* no alteraban ni los niveles de expresión de *fleQ*, ni la cantidad de flagelina producida, indicando que estos dos genes debían actuar a través de vías de regulación alternativas (Navazo y col., 2009; Barahona 2011).

En F113, la ruta Rsm interviene en la represión de la movilidad, ya que la sobreexpresión de cualquiera de los genes *rsmA* o *rsmE* mimetiza el fenotipo de los mutantes *gac*⁻. Nuestros resultados indican que respecto al movimiento, las proteínas RsmA y RsmE son funcionalmente equivalentes (figura 11). Esta equivalencia funcional se ha observado también en otros caracteres regulados positivamente por este sistema como la producción de exoproteasa, HCN o DAPG en *P. fluorescens* CHA0

(Reimann y col., 2005), aunque no se sabe con certeza si es así en todos los rasgos controlados por el sistema Rsm. Se ha descrito recientemente que en *P. aeruginosa*, el sistema de dos componentes BfiS/R regula la formación de biopelículas, controlando los niveles de uno de los ARN de pequeño tamaño descritos en pseudomonas, *rsmZ*, pero no de *rsmY*. Este hecho indica que no todos los riborreguladores participan en el control de los mismos fenotipos (Petrova y Sauer, 2010). Además, algunas especies de pseudomonas, como *P. aeruginosa*, producen una única proteína Rsm (Pessi y col., 2001) mientras que otras, como en el caso de *P. fluorescens* F113, sintetizan más de dos proteínas de este tipo: RsmA, E e I (Reimann y col., 2005).

En nuestro laboratorio ya se había descrito con anterioridad que los variantes fenotípicos hipermóviles de F113 aislados de la rizosfera, que presentaban mutaciones en los genes *gac*, producían mayor cantidad de flagelina (FliC) y poseían flagelos más largos que la cepa silvestre (Sánchez-Contreras y col., 2002). Siendo FleQ el activador transcripcional de la síntesis del flagelo en pseudomonas (Dasgupta y col., 2003), decidimos comprobar si el sistema Gac actuaba a través de esta proteína en la regulación de la movilidad tipo *swimming*. Nuestros resultados muestran que el sistema Gac regula la transcripción de *fleQ* y *fliC* (figura 10), y que esta regulación es llevada a cabo a través de las proteínas RsmA y RsmE (figura 11). Estos resultados concuerdan con los publicados en *P. aeruginosa* que muestran cómo mutantes en *gacA* y *rsmYZ* presentan una mayor expresión de FliC y FliD (entre 7,5 y 10,2 veces) comparados con la cepa silvestre (Kay y col., 2006).

El sistema Gac regula la movilidad a través de la ruta Rsm, cuya acción repercute finalmente sobre la transcripción de *fleQ*. Se presentan entonces dos alternativas posibles: bien que las proteínas RsmA y RsmE se unan a ARNm de activadores transcripcionales estabilizándolos, o bien que estas proteínas se unan a ARNm que codifiquen represores transcripcionales de genes activadores. La primera posibilidad, es la que se da en *E. coli* con un homólogo de RsmA, CsrA (Wei y col., 2001). En esta bacteria, CsrA se une al ARNm de los genes *flhDC*, que codifican el regulador principal de la biosíntesis de flagelo. La segunda opción, en la que se produciría por ejemplo la unión de las proteínas RsmA y E al ARNm de un represor transcripcional de *fleQ*, podría explicar el fenotipo observado en los mutantes *gac*⁻. En nuestro laboratorio, se ha analizado la posible implicación de dos represores potenciales descritos con anterioridad, en esta ruta de señalización: Vfr y AmrZ (Dasgupta y col., 2003; Tart y

col., 2006). Resultados previos descartaron que Vfr participase en la regulación de la movilidad tipo *swimming* mediada por el sistema Gac (Martínez-Granero, 2006), sin embargo, AmrZ sí se encuentra implicado en dicha regulación. En *P. aeruginosa* se ha observado que la transición de células móviles a sésiles (aflageladas) con fenotipo mucoso, que se produce durante la infección crónica, está mediada por este represor, siendo necesario el factor sigma AlgU (σ^{22}) para su expresión (Tart y col., 2006). En este sentido, en *P. fluorescens* F113 hemos observado una cascada de regulación similar, donde AlgU es necesario para la expresión de *amrZ* y por tanto para la represión de *fleQ*, provocando la disminución de la síntesis del flagelo.

La regulación positiva mediada por Gac se produce normalmente en la transición de fase exponencial a estacionaria y por ello, el sistema Gac se ha definido como un activador global del metabolismo secundario en esta última fase. Además, ya ha sido ampliamente descrita la relación entre el sistema Gac y RpoS, el factor sigma de fase estacionaria (Whistler y col., 1998; Chatterjee y col., 2003; Heeb y col., 2005). En lo referente a la movilidad, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que la cantidad de flagelina (FliC) y el porcentaje de células flageladas eran mayores en los mutantes *gac*⁻, y en las cepas que sobreexpresaban los genes *rsmA* y *rsmE*, en fase de crecimiento exponencial (D.O.₆₀₀ = 0,3), que los observados en la cepa silvestre. Estas diferencias no se apreciaban en el ensayo realizado con las proteínas extraídas en fase de crecimiento estacionaria (D.O.₆₀₀ = 3,5). Por lo que el sistema Gac está regulando negativamente la síntesis del flagelo durante la fase de crecimiento exponencial (Martínez-Granero, 2006; Martínez-Granero y col., en revisión), lo que concuerda con el hecho de que la expresión máxima del gen *gacS* se produzca en mitad de esta fase de crecimiento (Dubern y Bloemberg, 2006).

En cuanto al mecanismo de la represión del movimiento llevado a cabo por la proteína SadB, en *P. fluorescens* F113 los resultados indican que no actúa como el sistema SadC/BifA modulando la función flagelar, sino que al igual que el sistema Gac, reprime la expresión de *fleQ* a través del factor sigma AlgU y de la proteína AmrZ. La activación de AlgU se produce a nivel de su transcripción, y debido a las características de SadB, parece realizarse de forma indirecta.

En conjunto, estos resultados muestran que la represión de la movilidad a nivel de la biosíntesis del flagelo en *P. fluorescens* F113, se encuentra regulada por una compleja

red en la que están implicados tanto el sistema Gac, como la proteína SadB. Ambos controlan de manera cooperativa e independiente, la expresión de *algU*, y posiblemente también su traducción. Así, proponemos un posible modelo que explica la regulación de la movilidad a través de esta ruta (figura 22).

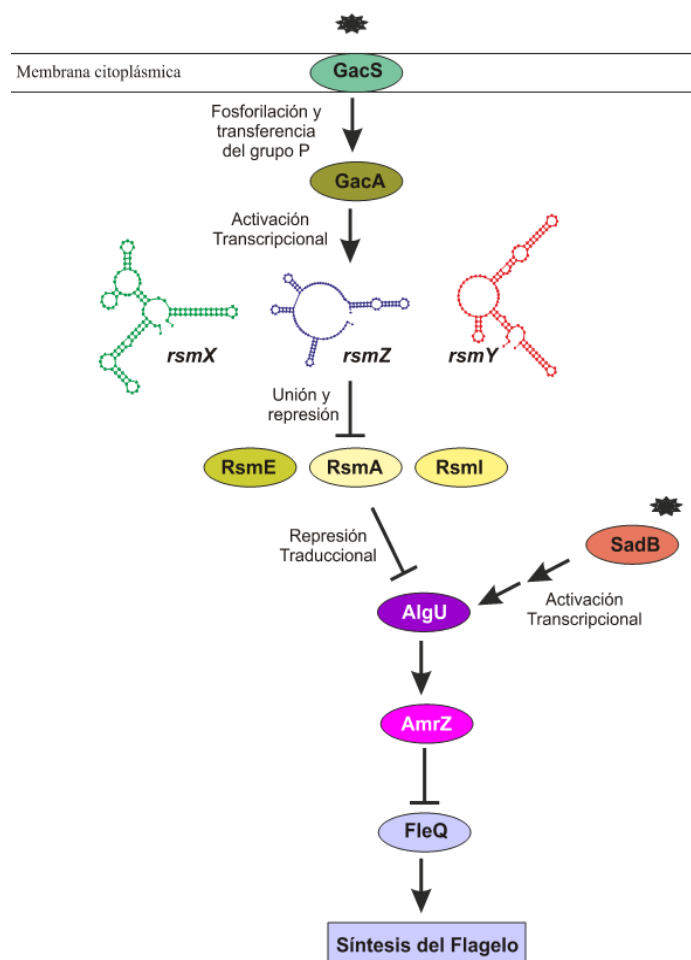


Figura 22: Modelo propuesto para explicar la señalización de las rutas Gac/Rsm y SadB en la represión ambiental de la movilidad en *P. fluorescens* F113. Las rutas Gac/Rsm y SadB reprimen de forma independiente la expresión de *algU*, factor sigma necesario para la síntesis de AmrZ, quien directa o indirectamente reprime la síntesis de *fleQ*, el regulador principal de la síntesis del flagelo en pseudomonas. Las flechas indican activación, y las líneas perpendiculares, represión.

El sistema de dos componentes GacA/GacS detectaría determinadas señales ambientales, que permitirían el inicio de la cascada de señalización Rsm, permitiendo la traducción del ARNm policistrónico *algUmucAB* (figura 13). El gen *algU* se encuentra también regulado a nivel transcripcional por SadB que se activaría en respuesta a señales provenientes del citoplasma, posiblemente di-GMPc (Merrit y col., 2007). AlgU es el factor sigma necesario para la expresión de *amrZ* donde su producto a su vez

regula negativamente la transcripción de *fleQ*, dando como resultado una menor producción de los componentes del flagelo, incluyendo la flagelina FliC.

Este modelo vincula la percepción de señales ambientales a través de un receptor en la membrana (GacS) y un receptor citoplasmático (SadB), con la producción de componentes del filamento flagelar activada por FleQ, e identifica a AlgU como un importante nódulo en la regulación ambiental de la movilidad. Este factor sigma es también necesario para la expresión del gen *kinB*, que regula la biosíntesis del polisacárido alginato (Wozniak y Ohman, 1994; Ma y col., 1997; Damron y col., 2009), y además está implicado en la regulación de la movilidad en *P. fluorescens* F113 (Barahona y col., 2011), ya que interviene en la síntesis de un segundo aparato flagelar similar al de *Azotobacter vinelandii* (Barahona, 2011).

3. Regulación a nivel del funcionamiento del flagelo

En relación con el sistema Wsp, ha quedado patente que su implicación en la regulación de la movilidad no está relacionada con la biosíntesis del flagelo, así que debe ejercer su efecto represor a otro nivel. Puesto que el efector final del sistema presenta actividad DGC, su acción podría estar relacionada con el metabolismo del segundo mensajero di-GMPc. Entender cómo se produce la señalización a través de este segundo mensajero en el mundo bacteriano es uno de las cuestiones más estudiadas en los últimos tiempos, ya que su concentración determina la transición entre los estilos de vida libre y sésil en distintas estirpes bacterianas como *Caulobacter crescentus* (Paul y col., 2004) o en distintas especies de pseudomonas (Caiazza y col., 2007; Barahona y col., 2010).

Sin embargo, no se sabe con exactitud cómo ejercen su efecto en la célula los niveles de di-GMPc. Mediante análisis bioinformáticos se identificó un dominio de unión a este segundo mensajero: PilZ, ampliamente representado en prácticamente todo tipo de proteobacterias y sobre el que se ha descrito que existe una correlación total entre la presencia o ausencia de dominios GGDEF y EAL y la presencia o ausencia de dominios PilZ (Amikam y Galperin, 2006). Estos dominios PilZ forman numerosas asociaciones con otros dominios, e intervienen en los mecanismos de señalización relacionados con el di-GMPc.

En *P. fluorescens* F113 hemos encontrado 42 proteínas con dominios GGDEF, 35 que presentan dominios tipo EAL, y 38 proteínas con ambos dominios, que podrían estar

regulando los niveles de di-GMPc. En primer lugar, y por comparación de secuencias encontramos el sistema SadC/BifA, que como ya se ha comentado, son dos proteínas transmembrana que presentan actividad DGC y PDE respectivamente, y que regulan de manera inversa, a través de la modulación de los niveles de di-GMPc, la formación de biopelículas, la tasa de cambio de sentido de la rotación del motor del flagelo y la movilidad tipo *swarming* en *P. aeruginosa* PA14 (Caiazza y col., 2007; Kuchma y col., 2007; Merrit y col., 2007). En *P. fluorescens* F113, el mutante *sadC*⁻ presenta una mayor movilidad tipo *swimming* y se encuentra afectado en la formación de biopelículas comparado con la estirpe silvestre, mientras que observamos el fenotipo contrario en el caso de un mutante *bifA*⁻ (figuras 16 y 20). Además, el doble mutante *sadC*⁻*bifA*⁻, no muestra diferencias significativas en cuanto a movilidad con respecto a la estirpe silvestre, lo que parece indicar que los productos de estos dos genes forman parte de un único sistema de síntesis y degradación de di-GMPc, cuyos niveles llevarían a la bacteria hacia a un estilo de vida móvil o sésil. Al contrario que en *P. aeruginosa* (Merrit y col., 2007), a este sistema no parecen contribuir otras proteínas con actividad DGC ni PDE, ya que el fenotipo del doble mutante es muy similar al de la cepa silvestre.

Por otro lado, se encontrarían los genes del operón *wsp*, cuyos productos, parecen funcionar de manera similar a como actúan las proteínas que configuran los sistemas de quimiotaxis bacterianos. Las proteínas Wsp, a través de una cadena de fosforilación/defosforilación serían capaces de percibir y transmitir una determinada señal hasta el efector del sistema WspR. La fosforilación del dominio sensor de la proteína WspR provocaría la activación del dominio efector con actividad DGC, y por tanto, llevaría a un aumento en los niveles del segundo mensajero di-GMPc (Hickman y col., 2005). En el caso de *P. fluorescens* F113, ya se ha comentado que esta proteína parece estar implicada tanto en la represión de la movilidad tipo *swimming* y *swarming* (Navazo y col., 2009), como en la formación de biopelículas (Barahona y col., 2010).

El nexo de unión entre los sistemas SadC/BifA y Wsp en nuestra cepa de estudio, parece ser la proteína FlgZ, que muestra homología con YcgR una proteína de unión a di-GMPc en enterobacterias (Schmidt y col., 2005; Ryjenkov y col., 2006). FlgZ presenta un dominio YcgR en el extremo N-terminal y otro tipo PilZ en el extremo C-terminal y su gen ortólogo en *P. putida* codifica una proteína capaz de unir dos moléculas de di-GMPc. Esta unión determina la transición entre dímero y monómero de

dicha proteína (Ko y col., 2010). En *P. fluorescens* F113, esta proteína está codificada por un gen que pertenece al mismo operón que *flgAMN*, y su expresión depende de reguladores flagelares como FliA y FleQ, indicando que es un gen flagelar. Este gen está conservado en homología de secuencia y contexto genético en todas las pseudomonas cuyo genoma ha sido secuenciado, por lo que es posible que comparta la misma función dentro del género *Pseudomonas*.

El dominio PilZ de la proteína YcgR de enterobacterias es capaz de unir di-GMPc *in vitro* con una alta afinidad, y podría provocar respuestas a pequeños cambios en los niveles intercelulares de di-GMPc (Amikam y Galperin, 2006). Este tipo de proteínas controlan la movilidad en enterobacterias (YvgR) y *C. crescentus* (DgrA), pero no afectan a la expresión de los genes flagelares, sino que interfieren directamente con la función motora del flagelo ensamblado (Christen y col., 2007; Girgis y col., 2007; Pesavento y col., 2008); inhibiendo la movilidad al interactuar con el complejo de rotación del flagelo (Wolfe y Visick, 2008; Boehm y col., 2010; Fang y Gomersky 2010; Paul y col., 2010). Se ha observado que YcgR se une a este complejo incluso en ausencia de di-GMPc, lo que permite dar una respuesta prácticamente instantánea en cuanto se detecta un aumento en estos niveles (Fang y Gomersky, 2010). Tras visualizar la localización celular de la proteína YcgR, varios estudios determinaron que esta proteína se sitúa en la base del flagelo (Boehm y col., 2010; Paul y col., 2010), donde ejerce su función interactuando con el motor, y se han propuesto dos modelos: (i) que interactúe con FliG, proteína implicada directamente en la unión con el estator para la rotación del motor (Fang y Gomersky, 2010; Paul y col., 2010), o (ii) que lo haga con MotA, componente del estator que interactúa con FliG en la rotación del motor (Boehm y col., 2010). Cuando YcgR se une a di-GMPc, se producen cambios conformacionales en la proteína (Ryjenkov y col., 2006; Benach y col., 2007; Ko y col., 2010) que provocan la interacción con las proteínas del motor, alterando la superficie de unión entre el rotor y el estator, de manera que se reduce la eficiencia en la generación del par de torsión, se disminuye la velocidad de rotación del motor y se induce la rotación del flagelo en sentido CCW (Fang y Gomersky, 2010; Paul y col., 2010). De este modo, YcgR ejercería una regulación de la movilidad a nivel post-traducciona actuando como un freno en dos sentidos: disminuyendo la velocidad del motor e induciendo preferencialmente su rotación en una dirección (Paul y col., 2010).

En *P. fluorescens* F113, las imágenes de microscopía confocal (figura 21) muestran que la proteína FlgZ podría actuar de manera similar, mediante unión a algún componente del motor flagelar, dado que se localiza en el polo donde se encuentra situado el flagelo. La proteína FlgZ detectaría los niveles de di-GMPc resultantes de la acción de los sistemas SadC/BifA y Wsp, y respondería frenando o no el motor flagelar. De acuerdo con esta hipótesis, mutantes en los genes que codifican enzimas con actividad DGC, *sadC* y *wspR*, que presentarían bajos niveles de di-GMPc, muestran una movilidad superior a la de la cepa silvestre: FlgZ detectaría niveles más bajos de di-GMPc que en F113 y frenaría el motor en menor medida. El caso más extremo sería el que se observa en el doble mutante *sadC⁻wspR⁻*, mutante en ambas DGC, con una movilidad superior a la de los mutantes individuales, y donde la proteína FlgZ no podría detectar di-GMPc, y por tanto, no frenaría el motor del flagelo. De hecho, la proteína FlgZ en este mutante ni siquiera se localiza en el polo celular (figura 21), sino que aparece de manera difusa en el citoplasma, corroborando la idea de que en este caso, FlgZ no se encuentra ejerciendo su acción de freno del motor.

De manera inversa, FlgZ captaría altos niveles del mensajero en el mutante *bifA⁻*, que no presentaría actividad PDE, y se activaría interfiriendo con el motor del flagelo, disminuyendo la movilidad. Así, en el mutante *bifA⁻*, la proteína FlgZ se sitúa en el polo de la célula donde se encuentra el flagelo (figura 21). Sin embargo, también el doble mutante *bifA⁻flgZ⁻* muestra el mismo fenotipo que el mutante simple *bifA⁻*, cuando FlgZ no puede ejercer su acción de freno del motor. Esto podría significar que el di-GMPc ejercería la represión del movimiento por otras vías independientes a FlgZ. Cuando no existe FlgZ, el di-GMPc sintetizado no es captado por ningún efector local, por lo que esta señal podría difundir libremente por el citoplasma ejerciendo su función a través de otro efector. Lo mismo ocurriría en el caso de los dobles mutantes *sadC⁻flgZ⁻* y *wspR⁻flgZ⁻*, cuyos niveles de di-GMPc se corresponderían con los de los mutantes individuales *sadC⁻* y *wspR⁻* respectivamente, no existiendo el efector local que responda al di-GMPc generado. Resultados similares han sido observados en *Salmonella*, donde los altos niveles de di-GMPc presentes en mutantes afectados en proteínas con actividad PDE, reprimen la movilidad incluso en ausencia de la proteína YcgR (I. Lasa, comunicación personal).

YcgR también ha sido descrita como una proteína que participa en la transición del estilo de vida móvil a la formación de biopelículas. En concreto parece estar involucrada en las primeras etapas de adhesión al sustrato (Fang y Gomersky, 2010). Esta proteína provoca una reducción de la velocidad de la movilidad tipo *swimming* durante la entrada en fase estacionaria (Girgis y col., 2007; Pesavento y col., 2008), cuando las células cambian de estilo de vida de móvil a sésil. En el caso de *P. fluorescens*, donde los niveles de di-GMPc también determinan el estilo de vida de la bacteria (Barahona y col., 2010), la capacidad de formación de biopelículas de los mutantes individuales parece corresponderse con los niveles de di-GMPc de la célula. Sin embargo, el hecho de que todos los mutantes en *flgZ* estén afectados y presenten el mismo fenotipo en cuanto a su capacidad de formación de biopelículas, siendo el fenotipo del mutante en *flgZ* epistático en todos los dobles mutantes, sugiere que el producto codificante de este gen tiene un papel clave en la correcta formación de la estructura.

En resumen, la proteína FlgZ de *P. fluorescens* F113, que presenta un dominio PilZ, es capaz de responder a los niveles de di-GMPc resultantes de la actividad de dos sistemas de señalización independientes entre sí: el sistema SadC/BifA y el sistema Wsp, donde la unión del segundo mensajero a la proteína provocaría un cambio en el patrón de rotación del flagelo que daría lugar a una disminución de la movilidad tipo *swimming*. La incapacidad de las células para migrar, favorecería las posibilidades de adhesión al sustrato (Wolfe y Berg, 1989) y con ello el aumento en la de formación de biopelículas, vinculando así los fenómenos de formación de biopelículas y la movilidad, de manera inversa a través de la señalización vía di-GMPc por la proteína FlgZ. Así, proponemos un modelo de regulación de la movilidad, una vez que el flagelo se encuentra completamente ensamblado, controlado por los niveles de di-GMPc (figura 23).

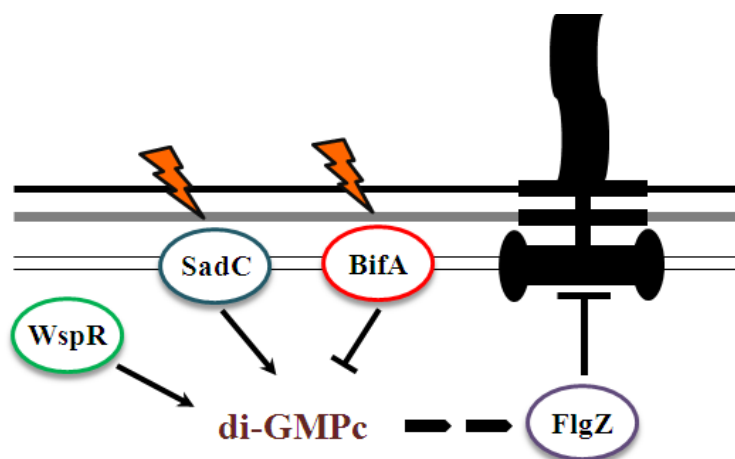


Figura 23: Modelo propuesto para explicar la señalización de las rutas SadC/BifA y Wsp en la represión de la movilidad en *P. fluorescens* F113. Ambas rutas controlan los niveles de di-GMPc que son detectados por la proteína FlgZ, que interfiere directamente con el motor del flagelo, afectando el patrón de rotación. Las flechas indican activación, y las líneas perpendiculares, represión.

4. El movimiento de *Pseudomonas fluorescens* F113 está regulado por una red compleja de señalización.

Los resultados aquí presentados, junto con resultados anteriores obtenidos en nuestro laboratorio, nos permiten proponer un modelo para la regulación ambiental de la movilidad en *P. fluorescens* F113 (figura 24). Este modelo integra los tres niveles de regulación en una compleja red de transducción de señales, en la que las tres rutas están interconectadas.

La primera ruta regula la movilidad a través de la represión en la biosíntesis del flagelo típico de *pseudomonas*, cuyo regulador principal es FleQ. En esta vía están implicadas tanto las proteínas de la cascada Gac/Rsm, como la proteína SadB, que a través de la regulación de *algU* de forma independiente, estarían reprimiendo finalmente la expresión de *fleQ* (Martínez-Granero y col., en revisión).

La segunda vía controla la síntesis del segundo flagelo, cuyo regulador principal es FlhDC. En esta vía estaría implicado también el factor sigma AlgU, y además la proteína KinB. La actividad de ambos reprimiría la producción del segundo flagelo a nivel de la expresión del factor *vfr* (Barahona, 2011). La primera y la segunda vía confluyen a nivel de AlgU, que permite la transcripción de *amrZ* y *kinB*. AmrZ es un represor de *fleQ*, mientras que KinB reprime la síntesis del segundo flagelo. De este modo, a través de AlgU se inhibe la expresión de *fleQ* y *flhDC*, y por tanto la síntesis de flagelos y la movilidad.

Y por último la vía que regula la funcionalidad del flagelo, a través de los niveles de di-GMPc. En esta última vía estarían implicados los sistemas Wsp (DGC) y SadC/BifA (DGC/PDE), así como la proteína FlgZ, que detectaría los niveles del segundo mensajero e interferiría con el motor flagelar en respuesta a dichos niveles. Esta última vía podría intervenir en la regulación de la movilidad tanto del primer como del segundo sistema flagelar de *P. fluorescens* F113.

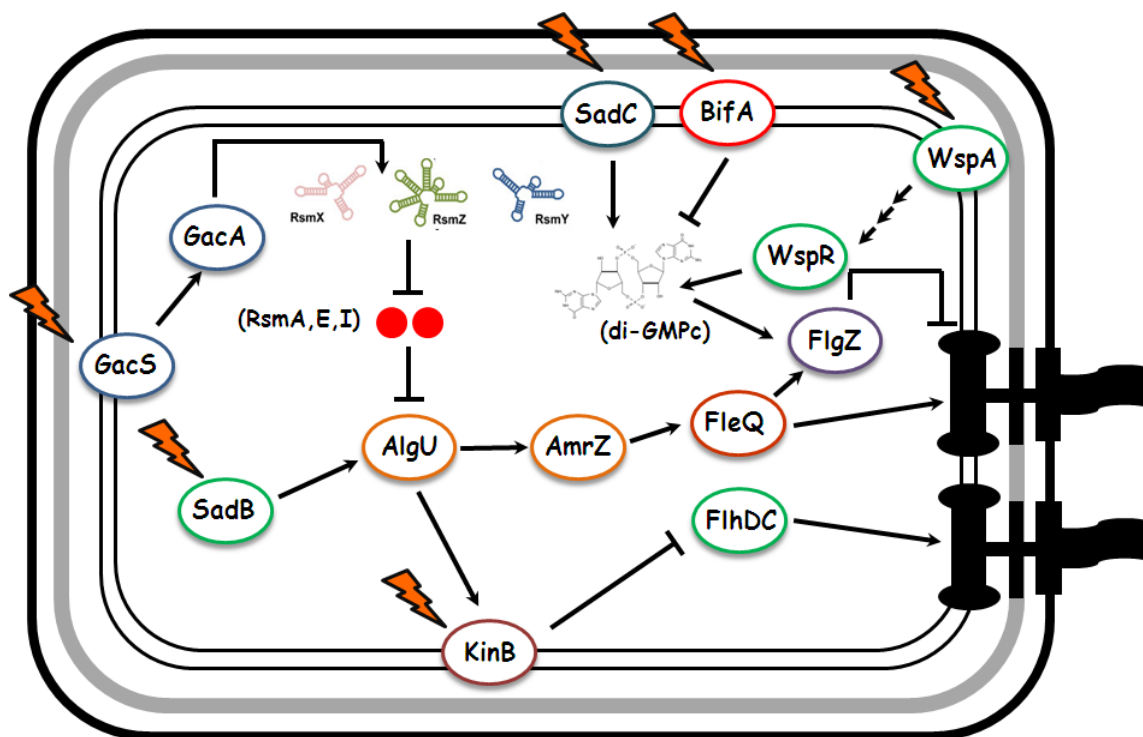


Figura 24: Modelo global de la regulación ambiental de la movilidad en la cepa *P. fluorescens* F113.

En este modelo destaca el papel central que juega el factor sigma AlgU. Este factor sigma está directamente implicado en la regulación de la síntesis de los dos tipos de flagelos producidos por F113, e interviene de forma indirecta en la regulación del funcionamiento del flagelo a través de la represión de *fleQ*, ya que a su vez, la proteína FleQ ejercería como un activador en la transcripción de *flgZ*. AlgU está implicado en la regulación de la producción del exopolisacárido alginato en varias especies de pseudomonas (Mohr y col., 1992; Wozniak y Ohman, 1994; Fakhr y col., 1999; Li y col., 2010), y en la tolerancia a estreses ambientales en *P. fluorescens* (Schnider-Keel y col., 2001) y en *P. syringae* (Keith y Bender, 2001). Además, recientemente se ha mostrado que la proteasa AlgW, implicada en la proteólisis de MucA, y que por tanto regula post-traduccionamente los niveles de AlgU en *P. syringae*, es un importante

regulador de múltiples factores de virulencia, así como de la cantidad de flagelina (Schreiber y Desveaux, 2011). De esta forma, los niveles de AlgU están regulados a nivel transcripcional y post-transcripcional, como muestran nuestros resultados, y también a nivel post-traducciona l a través de la proteasa AlgW. Todos estos datos muestran que AlgU es un nodo clave en la regulación de la adaptación ambiental de las pseudomonas.

El modelo de regulación que presentamos identifica un número considerable de genes y proteínas implicados en la transducción de señales ambientales que modulan el movimiento de F113. En el modelo aparecen cinco proteínas localizadas en la membrana citoplasmática con capacidad para detectar cambios en las condiciones extracelulares, aunque aún no se ha podido determinar la naturaleza de dichas señales. En cuanto a las señales intracelulares, se han descrito dos proteínas que detectan cambios en el interior de la célula: FlgZ y SadB. En el caso de FlgZ, la señal es el di-GMPc, mientras que se han propuesto los ramnolípidos y el propio di-GMPc, como señales detectadas por la proteína SadB.

Por último, cabe destacar que el funcionamiento de la red identificada en F113 para la regulación del movimiento no es generalizable a otras especies bacterianas, ni incluso a estirpes de ésta misma especie. En un trabajo reciente, Newell y col. (2011b) analizan el fenotipo de movilidad y formación de biopelículas de treinta proteínas con actividad DGC, codificadas en el genoma de *P. fluorescens* Pf-01, observándose que proteínas ortólogas en esta bacteria y F113 presentan diferentes fenotipos. Sin embargo, muchos de los genes y proteínas clave de la regulación del movimiento en F113, forman también parte central de estudios llevados a cabo en otras pseudomonas en relación con las respuestas a cambios en el ambiente, indicando que distintas estirpes de pseudomonas utilizan las mismas proteínas en diferentes redes de transducción de señal, para adaptarse a las condiciones ambientales en las que se encuentran.

Conclusiones

1. En la cepa *P. fluorescens* F113, el sistema Gac regula la biosíntesis del flagelo a través de la cascada formada por los ARN reguladores, y las proteínas Rsm, durante la fase de crecimiento exponencial. En esta cascada se encuentran implicados tanto AmrZ, represor del regulador flagelar *fleQ*, como el factor sigma AlgU necesario para la expresión de AmrZ. Con un sistema Gac inactivo, la proteína RsmA se une al ARNm policistrónico constituido por *algUmucAmucB*, disminuyendo la transcripción de *amrZ*, permitiendo por tanto la expresión de *fleQ* y la biosíntesis del flagelo.
2. La proteína citoplasmática SadB está implicada en la represión de la movilidad tipo *swimming* y *swarming*, regulando la expresión de *fleQ*, e interfiriendo así en la biosíntesis del flagelo. Esta proteína ejerce su acción sobre el factor sigma AlgU, y a su vez sobre AmrZ. Los análisis de epistasia han demostrado que lo hace de forma independiente al sistema Gac. Así, tanto la cascada Gac/Rsm, como la proteína citoplasmática SadB están implicados, de forma independiente, en la regulación de la movilidad a nivel de la biosíntesis del flagelo, y convergen a nivel de la regulación del factor sigma *algU*.
3. *flgZ* es un gen flagelar que afecta a la movilidad tipo *swimming* en *P. fluorescens* F113, y su expresión está controlada por *fliA* y *fleQ*, del mismo modo que los genes flagelares del operón *flgAMN*, del que forma parte.
4. Los sistemas SadC/BifA y Wsp, regulan la movilidad tipo *swimming* de forma independiente, en una ruta que converge a nivel de la proteína FlgZ. Esta proteína, que en condiciones normales se encuentra localizada en la base del flagelo, podría detectar niveles de di-GMPc resultantes de la actividad de los sistemas SadC/BifA y Wsp e interaccionar con el motor del flagelo, como ocurre en otras especies que presentan proteínas homólogas a ella. Esta ruta de regulación de la movilidad es independiente de las rutas en las que participan el sistema Gac y la proteína SadB.

Referencias

- Aarons S., Abbas A., Adams C., Fenton A. y O'Gara F. (2000)** A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* **182**: 3913-3919.
- Abraham J.M., Freitag C.S., Clements J.R. y Eisenstein B.I. (1985)** An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **82**: 5724-5727.
- Achouak W., Conrod S., Cohen V. y Heulin T. (2004)** Phenotypic variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a plant root-colonization strategy. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**: 872-879.
- Aizawa S.I. (1996)** Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **19**: 1-5.
- Aizawa S.I., Dean G.E., Jones C.J., Macnab R.M. y Yamaguchi S. (1985)** Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **161**: 836-849.
- Aldridge P., Karlinsey J.E., Becker E., Chevance F.F. y Hughes K.T. (2006)** Flk prevents premature secretion of the anti-sigma factor FlgM into the periplasm. *Mol. Microbiol.* **60**: 630-643.
- Amikam D. y Galperin M.Y. (2006)** PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatic.* **22**: 3-6.
- Anderson J.K., Smith T.G. y Hoover T.R. (2010)** Sense and sensibility: flagellum-mediated gene regulation. *Trends Microbiol.* **18**: 30-37.
- Armitage J.P. (1999)** Bacterial tactic responses. *Adv. Microb. Physiol.* **41**: 229-289.
- Arora S.K., Ritchings B.W., Almira E.C., Lory S. y Ramphal R. (1997)** Transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J. Bacteriol.* **179**: 5574-5581.
- Arora S.K., Dasgupta N., Lory S. y Ramphal R. (2000)** Identification of two distinct types of flagellar cap proteins, FliD, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **68**: 1474-1479.
- Attmannspacher U., Scharf B.E. y Harshey R.M. (2008)** FliL is essential for swarming: motor rotation in absence of FliL fractures the flagellar rod in swarmer cells of *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **68**: 328-341.
- Babalola O.O. (2010)** Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.* **32**: 1559-1570.
- Bantinaki E., Kassen R., Knight C.G., Robinson Z., Spiers A.J. y Rainey P.B. (2007)** Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. III. Mutational origins of wrinkly spreader diversity. *Genetics.* **176**: 441-453.
- Barahona E., Navazo A., Yousef-Coronado F., Aguirre de Cárcer D., Martínez-Granero F., Espinosa-Urgel M., Martín M. y Rivilla R. (2010)** Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. *Environ. Microbiol.* **12**: 3185-3195.
- Barahona E. (2011)** Caracterización de variantes fenotípicos y mutantes de *Pseudomonas fluorescens* F113: colonización de la rizosfera, formación de biopelículas, movilidad y biocontrol. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.

- Barahona E., Navazo A., Martínez-Granero F., Zea-Bonilla T., Pérez-Jiménez R. M., Martín M., y Rivilla R. (2011)** A *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability shows improved biocontrol activity against fungal root pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 5412-5419.
- Barak R. y Eisenbach M. (1992)** Correlation between phosphorylation of the chemotaxis protein CheY and its activity at the flagellar motor. *Biochemistry.* **31**: 1821-1826.
- Bardy S.L., Ng S.Y. y Jarrell K.F. (2003)** Prokaryotic motility structures. *Microbiology* **149**: 295-304.
- Barea J. M., Pozo M. J., Azcón R., y Azcón-Aguilar C. (2005)** Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **56**: 1761-1778.
- Bashan Y. (1986)** Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *J. Gen. Microbiol* **132**: 3407-3414.
- Bauer W.D. y Mathesius U. (2004)** Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 429-433.
- Bazin M.J., Markham P., Scott E.M. y Lynch J.M. (1990)** Population dynamics and rhizosphere interactions. In: *The Rhizosphere. Wiley & Sons, Chichester*, pp. 99-127.
- Beatson S.A., Whitchurch C.B., Sargent J.L., Levesque R.C. y Mattick J.S. (2002)** Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **184**: 3605-3613.
- Belas R.E., Horikawa S., Aizawa S.I. y Suvanasuthi R. (2009)** Genetic determinants of *Silicibacter* sp. TM1040 motility. *J. Bacteriol.* **191**: 4502-4512.
- Benach J., Swaminathan S.S., Tamayo R., Handelsman S.K., Folta-Stogniew E., Ramos J.E., Forouhar F., Neely H., Seetharaman J., Camilli A. y Hunt J.F. (2007)** The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *EMBO J.* **26**: 5153-5166.
- Berg H.C. (2003)** The rotary motor of bacterial flagella. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 19-54.
- Blumer C., Heeb S., Pessi G. y Haas D. (1999)** Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 14073-14078.
- Boehm A., Kaiser M., Li H., Spangler C., Kasper C.A., Ackermann M., Kaefer V., Sourjik V., Roth V. y Jenal U. (2010)** Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell.* **141**: 107-116.
- Bordi C., Lamy M.C., Ventre I., Termine E., Hachani A., Fillet S., Roche B., Bleves S., Méjean V., Lazdunski A. y Filloux A. (2010)** Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **76**: 1427-1443.
- Bourret R.B. y Silversmith R.E. (2010)** Two-component signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 113-115.
- Bradford M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* **72**: 248-254.

- Braun T.F., Al-Mawsawi L.Q., Kojima S. y Blair D.F. (2004)** Arrangement of core membrane segments in the MotA/MotB protonchannel complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **43**: 35-45.
- Bren A. y Eisenbach M. (2000)** How Signals Are Heard during Bacterial Chemotaxis: Protein-Protein Interactions in Sensory Signal Propagation. *J. Bacteriol.* **182**: 6865-6873.
- Brencic A. y Lory S. (2009)** Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol. Microbiol.* **72**: 612-632.
- Brimer C.D. y Montie T.C. (1998)** Cloning and Comparison of *fliC* Genes and Identification of Glycosylation in the Flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* a-Type Strains. *J. Bacteriol.* **180**: 3209-3217.
- Brown P.N., Mathews M.A., Joss L.A., Hill C.P. y Blair D.F. (2005)** Crystal structure of the flagellar rotor protein FliN from *Thermotoga maritima*. *J. Bacteriol.* **187**: 2890-2902.
- Bull C.T., Weller D.M. y Thomashow L.S. (1991)** Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology*. **81**: 954-959.
- Bull C.T., Duffy B., Voisard C., Defago G., Keel C. y Haas D. (2001)** Characterization of spontaneous *gacS* and *gacA* regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **79**: 327-336.
- Burrowes E., Abbas A., O'Neill A., Adams C. y O'Gara F. (2005)** Characterisation of the regulatory RNA *rsmB* from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Res. Microbiol.* **156**: 7-16.
- Burrowes E., Baysse C., Adams C. y O'Gara F. (2006)** Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology*. **152**: 405-418.
- Caiazza N.C. y O'Toole G.A. (2004)** SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* **186**: 4476-4485.
- Caiazza N.C., Shanks R.M.Q. y O'Toole G.A. (2005)** Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**: 7351-7361.
- Caiazza N.C., Merritt J.H., Brothers K.M. y O'Toole G.A. (2007)** Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* **189**: 3603-3612.
- Caille O., Rossier C. y Perron, K. (2007)** A copperactivated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **189**: 4561-4568.
- Capdevila S., Martínez-Granero F.M., Sánchez-Contreras M., Rivilla R. y Martín M. (2004)** Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology*. **150**: 3889-3897.
- Chancey S.T., Wood D.W., Pierson E.A. y Pierson L.S. III (2002)** Survival of GacS/GacA mutants of the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3308-3314.
- Chatterjee A., Cui Y.Y., Yang H.L., Collmer A., Alfano J.R., y Chatterjee A.K. (2003)** GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in

Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 1106-1117.

Che F.S., Nakajima Y., Tanaka N., Iwano M., Yoshida T., Takayama S., Kadota I. y Isogai A. (2000) Flagellin from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* induces a resistance response in cultured rice cells. *J. Biol. Chem.* **275**: 32347-32356.

Chevance F.F. y Hughes K.T. (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 455-465.

Chin-A-Woeng T.F.C., de Priester W., van der Bij A.J. y Lugtenberg B.J.J. (1997) Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 79-86.

Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., Mulders I.H.M., Dekkers L.C. y Lugtenberg B.J.J. (2000) Root colonization is essential for biocontrol of tomato foot and root rot by the phenazine-1- carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1340-1345.

Choy W.K., Zhou L., Syn C.K.C., Zhang L.H. y Swarup S. (2004) MorA defines a new class of regulators affecting flagellar development and biofilm formation in diverse *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* **186**: 7221-7228.

Christen M., Christen B., Folcher M., Schauerte A. y Jenal U. (2005) Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J. Biol. Chem.* **280**: 30829-30837.

Christen M., Christen B., Allan M.G., Folcher M., Jenal P., Grzesiek S. y Jenal U. (2007) DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 4112-4117.

Couillerot O., Prigent-Combaret C., Caballero-Mellado J. y Moënne-Loccoz Y. (2009) *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* **48**: 505-512.

D'Argenio D.A., Calfee M.W., Rainey P.B. y Pesci E.C. (2002) Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J. Bacteriol.* **184**: 6481-6489.

Damron F.H., Qiu D. y Yu H.D. (2009) The *Pseudomonas aeruginosa* sensor kinase KinB negatively controls alginate production through AlgW-dependent MucA proteolysis. *J. Bacteriol.* **191**: 2285-2295.

Darzins A. (1994) Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **11**: 137-153.

Dasgupta N., Arora S.K. y Ramphal R. (2000) *fleN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**: 357-364.

Dasgupta N. y Ramphal R. (2001) Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**: 6636-6644.

- Dasgupta N., Ferrell E.P., Kanack K.J., West S.E.H. y Ramphal R. (2002)** *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is s^{70} dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* **184**: 5240-5250.
- Dasgupta N., Wolfgang M.C., Goodman A.L., Arora S.K., Jyot J., Lory S. y Ramphal R. (2003)** A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **50**: 809-824.
- Dasgupta N., Arora S.K. y Ramphal R. (2004).** The flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas*. Edited by J. L. Ramos. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 675-698.
- de Cárcer D.A., Martín M., Karlson U. y Rivilla R. (2007a)** Changes in bacterial populations and in biphenyl dioxygenase gene diversity in a PCB polluted soil after introducing willow trees for rhizoremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6224-6232.
- de Cárcer D.A., Martín M., Karlson U. y Rivilla R. (2007b)** The introduction of genetically modified microorganisms designed for rhizoremediation induces changes on native bacteria in the rhizosphere but not in the surrounding soil. *The ISME Journal*. **1**: 215-223.
- de Lorenzo V., Eltis L., Kessler B. y Timmis K.N. (1993)** Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacI^f/Ptrp-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene*. **123**: 17-24.
- De Mot R. y Vanderleyden J. (1994)** The C-terminal sequence conservation between OmpA-related outer membrane proteins and MotB suggests a common function in both gram-positive and gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan. *Mol. Microbiol.* **12**: 333-334.
- de Souza J.T., Mazzola M. y Raaijmakers J.M. (2003)** Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* **5**: 1328-1340.
- de Weert S., Vermeiren H., Mulders I.H.M., Kuiper I., Hendrickx N., Bloemberg G.V. Vanderleyden J., De Mot R. y Lugtenberg B.J. (2002)** Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 1173-1180.
- de Weger L.A., van der vlugt C.I.M., Wijffjes A.H.M., Bakker P.A.H.M., Schippers B. y Lugtenberg B. (1987)** Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol.* **169**: 2769-2773.
- Dekkers L.C., van der Bij A.J., Mulders I.H.M., Phoelich C.C., Wentwoord R.A.R., Glandorf D.C.M., Wijffelman C.A., y Lugtenberg B.J. (1998a)** Role of the O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and NADH: ubiquinone oxidoreductase (*nuo*) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 763-771.
- Dekkers L.C., Phoelich C.C., van der Fits L. y Lugtenberg B.J. (1998b)** A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 7051-7056.
- Dekkers L.C., Mulders C.H.M., Phoelich C.C., Chin-A-Woeng T.F.C., Wijffjes A.H.M y Lugtenberg B.J.J. (2000)** The *sss* colonization gene of the tomato-*Fusarium* f.sp. *radicis-*

lycopersici biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild type *Pseudomonas* spp. bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1177-1183.

Dubern J.F., Legendijk E.L., Lugtenberg B.J.J. y Bloemberg G.V. (2005) The heat shock genes *dnaK*, *dnaJ*, and *grpE* are involved in regulation of putisolvin biosynthesis in *Pseudomonas putida* PCL1445. *J. Bacteriol.* **187**: 5967-5976.

Dubern J.F. y Bloemberg G.V. (2006) Influence of environmental conditions on putisolvins I and II production in *Pseudomonas putida* strain PCL1445. *FEMS Microbiol. Lett.* **263**: 169-175.

Duffy B.K. y Défago G. (1999) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2429-2438.

Duffy B.K. y Défago G. (2000) Controlling instability in *gacS-gacA* regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3142-3150.

Dutta S. y Podile A.R. (2010) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Critical Rev. Microbiol.* **36**: 232-244.

Dybvig K. (1993) DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **10**: 465-471.

Dyer C.M., Vartanian A.S., Zhou H. y Dahlquist F.W. (2009) A molecular mechanism of bacterial flagellar motor switching. *J. Mol. Biol.* **388**: 71-84.

Elasri M., Delorme S., Lemanceau P., Stewart G., Laue B., Glickmann E., Oger P.M. y Dessaux Y. (2001) Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1198-1209.

Espinosa-Urgel M., Salido A. y Ramos J.L. (2000) Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J. Bacteriol.* **182**: 2363-2369.

Espinosa-Urgel M., Kolter R., y Ramos J.L. (2002) Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology.* **148**: 341-343.

Espinosa-Urgel M. (2004) Plant-associated *Pseudomonas* populations: molecular biology, DNA dynamics, and gene transfer. *Plasmid.* **52**: 139-150.

Fakhr M.K., Peñaloza-Vázquez A., Chakrabarty A.M. y Bender C.L. (1999) Regulation of alginate biosynthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* **181**: 3478-3485.

Fang X. y Gomelsky M. (2010) A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. *Mol. Microbiol.* **76**: 1295-1305.

Feinberg A. y Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.

Fenchel T. (2002) Microbial behavior in a heterogeneous world. *Science.* **296**: 1068-1071.

Fenton A.M., Stephens P.M., Crowley J., O'Callaghan M. y O'Gara F. (1992) Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3873-3878.

- Fernández L., Gooderham W.J., Bains M., McPhee J.B., Wiegand I. y Hancock R.E. (2010)** Adaptive resistance to the 'last hope' antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 3372-3382.
- Ferrández A., Hawkins A.C., Summerfield D.T. y Harwood C.S. (2002)** Cluster II che genes from *Pseudomonas aeruginosa* are required for an optimal chemotactic response. *J. Bacteriol.* **184**: 4374-4383.
- Figurski D.H. y Helinski D.R. (1979)** Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 1648-1652.
- Finan T.M., Kunkel B., De Vos G.F. y Signer E.R. (1986)** Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J. Bacteriol.* **167**: 66-72.
- Fletcher A. (1977)** The effects of culture concentration and age, time and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Can. J. Microbiol.* **23**: 1-6.
- Francis N.R., Sosinsky G.E., Thomas D. y DeRosier D.J. (1994)** Isolation, characterization, and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J. Mol. Biol.* **235**: 1261-1270.
- Fredrick K.L. y Helmann J.D. (1994)** Dual chemotaxis signaling pathways in *Bacillus subtilis*: A sigma-D-dependent gene encodes a novel protein with both CheW and CheY homologous domains. *J. Bacteriol.* **176**: 2727-2735.
- Freeman J.A. y Bassler B.L. (1999)** A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol. Microbiol.* **31**: 665-677.
- Frisk A., Jyot J., Arora S.K. y Ramphal R. (2002)** Identification and functional characterization of *flgM*, a gene encoding the anti-sigma 28 factor in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* **184**: 1514-1521.
- Garvis S., Munder A., Ball G., de Bentzmann S., Wiehlmann L., Ewbank J.J., Tümmler B. y Filloux A. (2009)** *Caenorhabditis elegans* semi-automated liquid screen reveals a specialized role for the chemotaxis gene *cheB2* in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *PLoS Pathog.* **5**: e1000540.
- Girgis H.S., Liu Y., Ryu W.S. y Tavazoie S. (2007)** A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. *PLoS Genet.* **3**: 1644-1660.
- Glick B. R. (2005)** Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.* **251**: 1-7.
- Glick B.R., Cheng Z., Czarny J. y Duan J. (2007)** Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**: 329-339.
- Gooderham W.J. y Hancock R.E. (2009)** Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 279-294.

- Goodman A.L., Kulasekara B., Rietsch A., Boyd D., Smith R.S. y Lory S. (2004)** A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev. Cell.* **7**: 745-754.
- Goodman A.L., Merighi M., Hyodo M., Ventre I., Filloux A. y Lory S. (2009)** Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev.* **23**: 249-259.
- Goymer P., Kahn S.G., Malone J.G., Gehrig S.M., Spiers A.J. y Rainey P.B. (2006)** Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. II. Role of the GGDEF regulator WspR in evolution and development of the wrinkly spreader phenotype. *Genetics.* **173**: 515-526.
- Güvener Z.T., Tifrea D.F. y Harwood C.S. (2006)** Two different *Pseudomonas aeruginosa* chemosensory signal transduction complexes localize to cell poles and form and remould in stationary phase. *Mol. Microbiol.* **61**: 106–118.
- Haas D. y Défago G. (2005)** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 307-319.
- Haas D. y Keel C. (2003)** Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**: 117-153.
- Han B., Pain A. y Johnstone K. (1997)** Spontaneous duplication of a 661 bp element within a two-component sensor regulator gene causes phenotypic switching in colonies of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of mushrooms. *Mol. Microbiol.* **25**: 211–218.
- Harshey R.M. (1994)** Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **13**: 389-394.
- Harshey R.M. (2003)** Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 249-273.
- Hassan M.T., van der Lelie D., Springael D., Römling U., Ahmed N. y Mergeay M. (1999)** Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* **238**: 417-425.
- Hassan K.A., Johnson A., Shaffer B.T., Ren Q., Kidarsa T.A., Elbourne L.D., Hartney S., Duboy R., Goebel N.C., Zabriskie T.M., Paulsen I.T. y Loper J.E. (2010)** Inactivation of the GacA response regulator in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 has far-reaching transcriptomic consequences. *Environ. Microbiol.* **12**: 899-915.
- Heeb S. y Haas D. (2001)** Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 1351-1363.
- Heeb S., Valverde C., Gigot-Bonnefoy C. y Haas D. (2005)** Role of the stress sigma factor RpoS in GacA/RsmA-controlled secondary metabolism and resistance to oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**: 251-258.
- Heurlier K., Williams F., Heeb S., Dormond C., Pessi G., Singer D., Cámara M., Williams P. y Haas D. (2004)** Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/rsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **186**: 2936-2945.

- Hickman J.W., Tifrea D.F. y Harwood C.S. (2005)** A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**: 14422-14427.
- Hickman J.W. y Harwood C.S. (2008)** Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol. Microbiol.* **69**: 376-389.
- Hinsa S.M., Espinosa-Urgel M., Ramos J.L., y O'Toole G.A. (2003)** Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol. Microbiol.* **49**: 905-918.
- Hirano T., Minamino T. y Macnab R.M. (2001)** The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of Salmonella FlgJ, a flagellum-specific muramidase. *J. Mol. Biol.* **312**: 359-369.
- Howie W.J., Cook R.J., y Weller D.M. (1987)** Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. *Phytopathol.* **77**: 286-292.
- Hrabak E.M. y Willis D.K. (1992)** The lemA gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean is a member of a family of two-component regulators. *J. Bacteriol.* **174**: 3011-3020.
- Humair B., Wackwitz B. y Haas D. (2010)** GacA-controlled activation of promoters for small RNA genes in *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 1497-1506.
- Jenal U., White J. y Shapiro L. (1994)** *Caulobacter* flagellar function, but not assembly, requires FliL, a non-polarly localized membrane protein present in all cell types. *J. Mol. Biol.* **243**: 227-244.
- Jones C.J., Macnab R.M., Okino H. y Aizawa S. (1990)** Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **212**: 377-387.
- Kalogeraki V.S y Winans S.C. (1997)** Suicide plasmids containing promoterless reporter genes can simultaneously disrupt and create fusions to target genes of diverse bacteria. *Gene*. **188**: 69-75.
- Kamilova F., Validov S., Azarova T., Mulders I. y Lugtenberg B. (2005)** Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* **7**: 1809-1817.
- Kamilova F., Kravchenko L.V., Shaposhnikov A.I., Makarova N. y Lugtenberg B.J.J. (2006)** Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 1121-1126.
- Kamilova F., Lamers G. y Lugtenberg B. (2008)** Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 inhibits germination of *Fusarium oxysporum* spores in tomato root exudate as well as subsequent formation of new spores. *Environ. Microbiol.* **10**: 2455-2461.
- Kang B.R., Yang K.Y., Cho B.H., Han T.H., Kim I.S., Lee M.C., Anderson A.J. y Kim Y.C. (2006)** Production of indole-3-acetic acid in the plant-beneficial strain *Pseudomonas chlororaphis* O6 is negatively regulated by the global sensor kinase GacS. *Curr. Microbiol.* **52**: 473-476.

- Karlinsey J.E., Tanaka S., Bettenworth V., Yamaguchi S., Boos W., Aizawa S.I. y Hughes K.T. (2000)** Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and *fliC* transcription. *Mol. Microbiol.* **37**:1220-1231.
- Kato J., Nakamura T., Kuroda A. y Ohtake H. (1999)** Cloning and characterization of chemotaxis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 155–161.
- Kato J., Kim H., Takiguchi N., Kuroda A. y Ohtake H. (2008)** *Pseudomonas aeruginosa* as a model microorganism for investigation of chemotactic behaviors in ecosystem. *J. Biosci. Bioeng.* **106**: 1-7.
- Kay E., Dubuis C. y Haas D. (2005)** Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**: 17136-17141.
- Kay E., Humair B., Dénervaud V., Riedel K., Spahr S., Eberl L., Valverde C. y Haas D. (2006)** Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**: 6026-6033.
- Keel C., Wirthner P., Oberhätsli T., Voisard C., Burger U., Haas D. y Défago G. (1990)** Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. *Symbiosis.* **9**: 327-341.
- Keith L.M. y Bender C.L. (2001)** Genetic divergence in the algT-muc operon controlling alginate biosynthesis and response to environmental stress in *Pseudomonas syringae*. *DNA Seq.* **12**: 125-129.
- Kiely P.D., Haynes J.M., Higgins C.H., Franks A., Mark G.L., Morrissey J.P. y O’Gara F. (2006)** Exploiting new systems-based strategies to elucidate plant-bacterial interactions in the rhizosphere. *Microb Ecol* **51**: 257-266.
- Kim Y.K. y McCarter L.L. (2000)** Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **182**: 3693-3704.
- Kinscherf T.G. y Willis D.K. (1999)** Swarming by *Pseudomonas syringae* B728a requires *gacS* (*lemA*) and *gacA* but not the acyl-homoserine lactone biosynthetic gene *ahlI*. *J. Bacteriol.* **181**: 4133-4136.
- Kirchner O. y Tauch A. (2003)** Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**: 287-299.
- Kitten T., Kinscherf T.G., McEvoy J.L. y Willis D.K. (1998)** A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **28**: 917–929.
- Kloepper J.W. y Schroth M.N. (1978)** Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: *In Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Ed. Station de Pathologie Végétale et Phytobactériologie Angers, France*, Vol. 2, pp. 879-882.
- Kloepper J.W., Lifshitz R. y Zablutowicz R.M. (1989)** Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* **7**: 39-44.
- Ko M. y Park C. (2000)** Two novel flagellar components and H-NS are involved in the motor function of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **303**: 371–382.

- Ko J., Ryu K.S., Kim H., Shin J.S., Lee J.O., Cheong C. y Choi B.S. (2010)** Structure of PP4397 reveals the molecular basis for different c-di-GMP binding modes by PilZ domain proteins. *J. Mol. Biol.* **398**: 97-110.
- Koch B., Nielsen T.H., Sorensen D., Andersen J.B., Christophersen C., Molin S., Givskov M., Sørensen J. y Nybroe O. (2002)** Lipopeptide production in *Pseudomonas* sp. strain DSS73 is regulated by components of sugar beet seed exudate via the Gac two-component regulatory system. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4509-4516.
- Kojima S. y Blair D.F. (2004)** Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **43**: 26-34.
- Kravchenko L.V., Azarova T.S., Leonova-Erko E.I., Shaposhnikov A.I., Makarova N.M. y Tikhonovich I.A. (2003)** Root exudates of tomato plants and their effect on the growth and antifungal activity of *Pseudomonas* strains. *Microbiol.* **72**: 37-41.
- Kravchenko L.V., Azarova T.S., Makarova N.M. y Tikhonovich I.A. (2004)** The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phyto stimulating activity of rhizobacteria. *Microbiol.* **73**: 156-158.
- Kuchma S.L., Brothers K.M., Merritt J.H., Liberati N.T., Ausubel F.M. y O'Toole G.A. (2007)** BifA, a cyclic-di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* **189**: 8165-8178.
- Kuiper I., Bloemberg G.V. y Lugtenberg B.J.J. (2001)** Selection of a plant-bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 1197-1205.
- Kushner S. (1978)** An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. In: Genetic engineering. Elsevier/North H. Bojer, S. Nicosi eds, Amsterdam, Holland, pp 17-23.
- Laemmli U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Lapouge K., Sineva E., Lindell M., Starke K., Baker C.S., Babitzke P. y Haas D. (2007)** Mechanism of *hcnA* mRNA recognition in the Gac/Rsm signal transduction pathway of *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Microbiol.* **66**: 341-356.
- Lapouge K., Schubert M., Allain F.H. y Haas D. (2008)** Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol. Microbiol.* **67**: 241-253.
- Laville J., Voisard C., Keel C., Maurhofer M., Defago G. y Haas D. (1992)** Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root-rot of tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 1562-1566.
- Li J.Y., Swanson R. V., Simon M. I. y Weis R. M. (1995)** The response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase CheA. *Biochemistry.* **34**: 14626-14636.
- Li X., Nielsen L., Nolan C. y Halverson L.J. (2010)** Transient alginate gene expression by *Pseudomonas putida* biofilm residents under water-limiting conditions reflects adaptation to the local environment. *Environ. Microbiol.* **12**: 1578-1590.
- Liao C.H., McCallus D.E., Wells J.M., Tzean S.S. y Kang G.Y. (1996)** The *repB* gene required for production of extracellular enzymes and fluorescent siderophores in *Pseudomonas*

viridiflava is an analog of the *gacA* gene of *Pseudomonas syringae*. *Can. J. Microbiol.* **42**: 177-182.

Lin C., Yang L., Yang J.J., Huang Y. y Liu Z.R. (2005) ATPase/helicase activities of p68 RNA helicase are required for pre-mRNA splicing but not for assembly of the spliceosome. *Mol. Cell Biol.* **25**: 7484-7493.

Lipton D.S., Blanchar R.W. y Blevins D.G. (1987) Citrate, malate, and succinate concentration in P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiol.* **85**: 315-317.

Lugtenberg B.J.J. y Dekkers L.C. (1999) What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environ. Microbiol.* **1**: 9-13.

Lugtenberg B.J.J., Kravchenko L.V. y Simons M. (1999) Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environ. Microbiol.* **1**: 439-446.

Lugtenberg B.J.J., Dekkers L.C. y Bloemberg G.V. (2001) Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**: 461-490.

Lugtenberg B.J.J., y Bloemberg G.V. (2004) Life in the rhizosphere. In: *Pseudomonas*. Eds Ramos J.L., New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, pp 403-430.

Lugtenberg B.J.J y Kamilova F. (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 541-556.

Ma S., Wozniak D.J. y Ohman D.E. (1997) Identification of the histidine protein kinase KinB in *Pseudomonas aeruginosa* and its phosphorylation of the alginate regulator *algB*. *J. Biol. Chem.* **272**: 17952-17960.

Macnab R.B. (1996) Flagella and motility. In: *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. F. Neidhardt, R. Curtis, J. Ingraham, E. Lin, K. Low, B. Magasanik, W. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter y H. Umberger, eds, ASM Press, Washington, DC, pp 123-145.

Macnab R.M. (2003) How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**: 77-100.

Malone J.G., Williams R., Christen M., Jenal U., Spiers A.J. y Rainey P.B. (2007) The structure-function relationship of WspR, a *Pseudomonas fluorescens* response regulator with a GGDEF output domain. *Microbiol.* **153**: 980-994.

Mandel M. y Higa A. (1970) Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162.

Marschner H. (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. *London Academic Press*.

Martínez-Gil M., Yousef-Coronado F. y Espinosa-Urgel M. (2010) LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. *Mol. Microbiol.* **77**: 549-561.

Martínez-Granero F., Capdevila S., Sánchez-Contreras M., Martín M. y Rivilla R. (2005) Two site-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol.* **151**: 975-983.

- Martínez-Granero F. (2006)** Variación Fenotípica y Movilidad: Papel en la colonización de la rizosfera por *Pseudomonas fluorescens*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
- Martínez-Granero F., Rivilla R. y Martin M. (2006)** Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3429-3434.
- Martínez-Granero F., Navazo A., Barahona E., Redondo-Nieto M., Rivilla R. y Martin M. (2011)** The Gac-Rsm and SadB signal transduction pathways converge on AlgU to downregulate motility in *Pseudomonas fluorescens*. *PLoS One*. En revisión.
- Masduki A., Nakamura J., Ohga T., Umezaki R., Kato J. y Ohtake H. (1995)** Isolation and characterization of chemotaxis mutants and genes of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **177**: 948-952.
- Matilla M.A., Espinosa-Urgel M., Rodríguez-Herva J.J., Ramos J.L. y Ramos-González M.I. (2007a)** Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biol.* **8**: R179.
- Matilla M.A., Ramos J.L., Duque E., de Dios Alché J., Espinosa-Urgel M. y Ramos-González M.I. (2007b)** Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* **9**: 1842-1850.
- Matilla M.A., Travieso M.L., Ramos J.L. y Ramos-González M.I. (2011)** Cyclic diguanylate turnover mediated by the sole GGDEF/EAL response regulator in *Pseudomonas putida*: its role in the rhizosphere and an analysis of its target processes. *Environ. Microbiol.* **13**: 1745-1766.
- McCarter L.L. (2001)** Polar flagellar motility of the Vibrionaceae. *Mol. Biol. Rev.* **65**: 445-462.
- McCarter L.L. (2006)** Regulation of flagella. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 180-186.
- McEvoy M., Bren A., Eisenbach M. y Dahlquist F.W. (1999)** Identification of the binding interfaces on CheY for two of its targets, the phosphatase CheZ and the flagellar switch protein FliM. *J. Mol. Biol.* **289**: 1423-1433.
- McPhee J.B., Lewenza S. y Hancock, R.E. (2003)** Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **50**: 205-217.
- Meharg A.A. y Killham K. (1995)** Loss of exudates from the roots of perennial ryegrass inoculated with a range of microorganisms. *Plant Soil.* **170**: 345-349.
- Mercado-Blanco J., y Bakker P.A.H.M. (2007)** Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek.* **92**: 367-389.
- Merritt J.H., Brothers K.M., Kuchma S.L. y O'Toole G.A. (2007)** SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *J. Bacteriol.* **189**: 8154-8164.
- Michiels K.W., Croes C.L. y Vanderleyden J. (1991)** Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2241-2246.
- Miller J.H. (1972)** Experiments in molecular genetics. In: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Minamino T. y Namba K. (2004)** Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 5-17.
- Minamino T., Imada K. y Namba K. (2008)** Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**: 693-701.
- Moënné-Loccoz Y., Tichy H.V., O'Donnell A., Simon R., y O'Gara F. (2001)** Impact of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 on intraspecific diversity of resident culturable fluorescent pseudomonads associated with the roots of field-grown sugar beet seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3418-3425.
- Mohr C.D., Leveau J.H., Krieg D.P., Hibler N.S. y Deretic V. (1992)** AlgR-binding sites within the algD promoter make up a set of inverted repeats separated by a large intervening segment of DNA. *J. Bacteriol.* **174**: 6624-6633.
- Molina L., Ramos C., Duque E., Ronchel M. .M., Wyke y L., Ramos, J.L. (2000)** Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 315-321.
- Morgan J. A., Bending G. D., y White P. J. (2005)** Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany.* **56**: 1729-1739.
- Murray T.S. y Kazmierczak B.I. (2006)** FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**: 6995-7004.
- Navazo A., Barahona E., Redondo-Nieto M., Martínez-Granero F., Rivilla R. y Martín M. (2009)** Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microb. Biotechnol.* **2**: 489-498.
- Nelson K.E., Weinelt C., Paulsen I.T., Dodson R.J., Hilbert H., Martins dos Santos V.A., Fouts D.E., Gill S.R., Pop M., Holmes M., Brinkac L., Beanan M., DeBoy R.T., Daugherty S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., White O., Peterson J., Khouri H., Hance I., Chris Lee P., Holtzapple E., Scanlan D., Tran K., Moazzez A., Utterback T., Rizzo M., Lee K., Kosack D., Moestl D., Wedler H., Lauber J., Stjepandic D., Hoheisel J., Straetz M., Heim S., Kiewitz C., Eisen J.A., Timmis K.N., Dusterhöft A., Tümmeler B. y Fraser C.M. (2002)** Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**: 799-808.
- Newell, P.D., Monds R.D. y O'Toole G.A. (2009)** LapD is a bis-(3,5)- cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**: 3461– 3466.
- Newell P.D., Boyd C. D., Sondermann H. y O'Toole G.A. (2011a)** A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. *PLoS Biol.* **9**: e1000587.
- Newell P.D., Yoshioka S., Hvorecny K.L., Monds R.D., y O'Toole G.A. (2011b)** Systematic Analysis of Diguanylate Cyclases That Promote Biofilm Formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *J. Bacteriol.* **193**: 4685–4698.
- O'Toole G.A. y Kolter R. (1998a)** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**: 295-304.
- O'Toole G.A. y Kolter R. (1998b)** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **28**: 449-461.

- Otto M. (2009)** Bacterial sensing of antimicrobial peptides. *Contrib. Microbiol.* **16**: 136-149.
- Palleroni N.J. (2008)** The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology* ed. Cornelis, Hethersett, UK: Caister Acad Press, pp. 1–18.
- Pandza S., Baetens M., Park C.H., Au T., Keyman M. y Matin A. (2000)** The G-protein FlhF has a role in polar flagellar placement and general stress response induction in *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* **36**: 414-423.
- Parker J.E. (2003)** Plant recognition of microbial patterns. *Trends Plant Sci.* **8**: 245-247.
- Paul R., Weiser S., Amiot N.C., Chan C., Schirmer T., Giese B. y Jenal U. (2004)** Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev.* **18**: 715-727.
- Paul K., Nieto V., Carlquist W.C., Blair D.F. y Harshey R.M. (2010)** The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a “backstop brake” mechanism. *Mol. Cell.* **38**: 128-139.
- Perron K., Caille O., Rossier C., Van Delden C., Dumas J.L. y Köhler T. (2004)** CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **279**: 8761-8768.
- Pesavento C., Becker G., Sommerfeldt N., Possling A., Tschowri N., Mehliis A. y Hengge R. (2008)** Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **22**: 2434-2446.
- Pessi G., Williams F., Hindle Z., Heurlier K., Holden M.T., Cámara M., Haas D. y Williams P. (2001)** The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and *N*-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**: 6676-6683.
- Petrova O.E. y Sauer K. (2010)** The novel two-component regulatory system BfiSR regulates biofilm development by controlling the small RNA *rsmZ* through CafA. *J. Bacteriol.* **192**: 5275-5288.
- Phillips D.A. y Streit W. (1995)** Legume signals to rhizobial symbionts: a new approach for defining rhizosphere colonization. In *Plant-Microbe Interactions*, ed. G. Stacey, N.T. Keen, New York: Chapman & Hall, pp 236-271.
- Phillips D.A., Fox T.C., King M.D., Bhuvaneswari T.V. y Teuber L.R. (2004)** Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots. *Plant Physiol.* **136**: 2887-2894.
- Pliego C., Cazorla F.M., González-Sánchez M.A., Pérez-Jiménez R.M., de Vicente A., y Ramos C. (2007)** Selection of biocontrol bacteria antagonistic toward *Rosellinia necatrix* by enrichment of competitive avocado root tip colonizers. *Research in Microbiology.* **158**: 463-470.
- Podile A.R. y Kishore G.K. (2006)** Plant growth-promoting rhizobacteria In: *SS Gnanamanickam, ed, Plant-Associated Bacteria. Netherlands: Springer*, pp 195-230.
- Pratt L.A. y Kolter R. (1998)** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* **30**: 285-293.

- Prouty M.G., Correa N.E., y Klose K.E. (2001)** The novel sigma54- and sigma28-dependent flagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **39**: 1595-1609.
- Raha M., Sockett H. y Macnab R. M. (1994)** Characterization of the *fliL* gene in the flagellar regulon of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**: 2308-2311.
- Rahme L.G., Stevens E.J., Wolfort S.F., Shao J., Tompkins R.G. y Ausubel F.M. (1995)** Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* **268**: 1899-1902.
- Rainey P.B. (1999)** Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environ. Microbiol.* **1**: 243-257.
- Redondo-Nieto M., Lloret J., Larenas J., Barahona E., Navazo A., Martínez-Granero F. Capdevila S., Rivilla R. y Martín M. (2008)** Transcriptional organization of the region encoding the synthesis of the flagellar filament in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* **190**: 4106-4109.
- Reimmann C., Beyeler M., Latifi A., Winteler H., Foglino M., Lazdunski A. y Haas D. (1997)** The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol. Microbiol.* **24**: 309-319.
- Reimmann C., Valverde C., Kay E. y Haas D. (2005)** Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.* **187**: 276-285.
- Rich J.J., Kinscherf T.G., Kitten T. y Willis D.K. (1994)** Genetic evidence that the *gacA* gene encodes the cognate response regulator for the *lemA* sensor in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* **176**: 7468-7475.
- Ritchings B.W., Almira E.C., Lory S. y Ramphal R. (1995)** Cloning and phenotypic characterization of *fleS* and *fleR*, new response regulators of *Pseudomonas aeruginosa* which regulate motility and adhesion to mucin. *Infect. Immun.* **63**: 4868-4876.
- Römling U. y Amikam D. (2006)** Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 218-228.
- Rotering H. y Dorner F. (1989)** Flagella vaccine. In H. Hoiby, S. Pedersen, G. H. Shand, G. Doring, and I. A. Holder ed., *Pseudomonas aeruginosa infections*. Karger AG, Basel, Switzerland, vol. 42. pp 218-228.
- Ryan R.P., Fouhy Y., Lucey J.F., Crossman L.C., Spiro S., He Y.W., Zhang L.H., Heeb S., Cámara M., Williams P. y Dow J.M. (2006)** Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**: 6712-6717.
- Ryjenkov D.A., Simm R., Römling U. y Gomelsky M. (2006)** The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J. Biol. Chem.* **281**: 30310-30314.
- Sacherer P., Defago G. y Haas D. (1994)** Extracellular protease and phospholipase-C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiol. Lett.* **116**: 155-160.

- Sadowski P. (1986).** Site-specific recombinases: changing partners and doing the twist. *J. Bacteriol.* **165**: 341-347.
- Saijo-Hamano Y., Uchida N., Namba K. y Oosawa K. (2004)** In vitro characterization of FlgB, FlgC, FlgF, FlgG, and FliE, flagellar basal body proteins of Salmonella. *J Mol Biol.* **339**: 423-435.
- Samatey F.A., Imada K., Nagashima S., Vonderviszt F., Kumasaka T., Yamamoto M. y Namba K. (2001)** Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature* **410**: 331-337.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sánchez-Contreras M., Martín M., Villaceros M., O'Gara F., Bonilla I. y Rivilla R. (2002)** Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* **184**: 1587-1596.
- Sarkar M.K., Paul K. y Blair D. (2010)** Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**: 9370–9375.
- Sato K. y Homma M. (2000)** Functional reconstitution of the Na⁺-driven polar flagellar motor component of *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* **275**: 5718-5722.
- Saunders N.J., Moxon E.R. y Gravenor M.B. (2003)** Mutation rates: estimating phase variation rates when fitness differences are present and their impact on population structure. *Microbiol* **149**: 485-495.
- Schäfer A., Tauch A., Jager W., Kalinowski J., Thierbach G. y Puhler A. (1994)** Small mobilizable multipurpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Scher F.M. y Baker R. (1982)** Effects of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium wilt* pathogens. *Phytopathology* **72**: 1567-1573.
- Scher F.M., Kloepper J.W., Singleton C., Zaleski I., y Laliberte M. (1988)** Colonization of soybean roots by *Pseudomonas* and *Serratia* species: relationship to bacterial motility, chemotaxis and generation time. *Phytopathol.* **78**: 1055-1059.
- Schippers B., Bakker A.W. y Bakker P.A.H.M. (1987)** Interactions of deleterious and beneficial microorganisms and the effect on cropping practices. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**: 339-358.
- Schlöter M., Wiehe W., Assmus B., Steindl H., Becke H., Höflich G. y Hartmann A. (1997)** Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii R39 studied with monospecific polyclonal antisera. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2038-2046.
- Schmidt A.J., Ryjenkov D.A. y Gomelsky M. (2005)** The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylatespecific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J. Bacteriol.* **187**: 4774-4781.

- Schmidt J., Müsken M., Becker T., Magnowska Z., Bertinetti D., Möller S., Zimmermann B., Herberg F. W., Jänsch L. y Häussler S. (2011)** The *Pseudomonas aeruginosa* Chemotaxis Methyltransferase CheR1 Impacts on Bacterial Surface Sampling. *PLoS One*. **6**: e18184.
- Schmidt-Eisenlohr H., Gast A. y Baron C. (2003)** Inactivation of *gacS* does not affect the competitiveness of *Pseudomonas chlororaphis* in the *Arabidopsis thaliana* rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1817-1826.
- Schnider-Keel U., Lejbølle K.B., Baehler E., Haas D. y Keel C. (2001)** The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5683-5693.
- Schoenhals G. J. y Macnab R.M. (1999)** FliL is a membrane-associated component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *Microbiol.* **145**: 1769-1775.
- Schreiber K.J. y Desveaux D. (2011)** AlgW regulates multiple *Pseudomonas syringae* virulence strategies. *Mol. Microbiol.* **80**: 364-377.
- Schubert M., Lapouge K., Duss O., Oberstrass F.C., Jelesarov I., Haas D. y Allain F.H. (2007)** Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nature Structural & Molecular Biology*. **14**: 807-813.
- Schuster S.C., Swanson R.V., Alex L.A., Bourret R.B. y Simon M.I. (1993)** Assembly and function of a quaternary signal transduction complex monitored by surface plasmon resonance. *Nature*. **365**: 343-347.
- Shanahan P., O'Sullivan D.J., Simpson P., Glennon J.D. y O'Gara F. (1992)** Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 353-358.
- Shimizu R., Taguchi F., Marutani M., Mukaihara T., Inagaki Y., Toyoda K., Shiraishi T. y Ichinose Y. (2003)** The *DfliD* mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, which secretes flagellin monomers, induces a strong hypersensitive reaction (HR) in non-host tomato cells. *Mol. Genet. Genomics*. **269**: 21-30.
- Simons M., van der Bij A.J., Brand I., de Weger L.A., Wijffelman C.A. y Lugtenberg B.J.J. (1996)** Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 600-607.
- Simons M., Permentier H.P., de Weger L.A., Wijffelman C.A. y Lugtenberg B.J.J. (1997)** Amino acid synthesis is necessary for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 102-106.
- Smith S.E. y Read D.J. (2008)** Mycorrhizal symbiosis. *3rd edn. Academic Press*.
- Sonnleitner E. y Haas D. (2011)** Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**: 63-79.
- Southern E. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-507.
- Sowa Y., Rowe A.D., Leake M.C., Yakushi T., Homma M., Ishijima A. y Berry R.M. (2005)** Direct observation of steps in rotation of the bacterial flagellar motor. *Nature*. **437**: 916-919.

- Spaink H.P., Okker R.J.H., Wijffelman C.A., Pees E. y Lugtenberg B.J.J. (1987)** Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* symplasmid pRL1J1. *Plant Mol. Biol.* **9**: 27-39.
- Spangenberg C., Heuer T., Burger C. y Tummeler B. (1996)** Genetic diversity of flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **396**: 213-217.
- Spiers A.J., Bohannon J., Gehrig S.M. y Rainey P.B. (2003)** Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol. Microbiol.* **50**: 15-27.
- Starnbach M.N. y Lory S. (1992)** The *fliA* (*rpoF*) gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes alternative sigma factor required for flagellin synthesis. *Mol. Microbiol.* **6**: 459-469.
- Stock A.M., Robinson V.L. y Goudreau P.N. (2000)** Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 183-215.
- Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J., Brinkman F.S., Hufnagle W.O., Kowalik D.J., Lagrou M., Garber R.L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L.L., Coulter S.N., Folger K.R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G.K., Wu Z., Paulsen I.T., Reizer J., Saier M.H., Hancock R.E., Lory S. y Olson M.V. (2000)** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature.* **406**: 959-964.
- Suaste-Olmos F., Domenzain C., Mireles-Rodríguez J.C., Poggio S., Osorio A., Dreyfus G. y Camarena L. (2010)** The flagellar protein FliL is essential for swimming in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **192**: 6230-6239.
- Tamayo R., Tischler A.D. y Camilli A. (2005)** The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* **280**: 33324-33330.
- Tart A.H., Wolfgang M.C. y Wozniak D.J. (2005)** The Alternative Sigma Factor AlgT Represses *Pseudomonas aeruginosa* Flagellum Biosynthesis by Inhibiting Expression of *fleQ*. *J. Bacteriol.* **187**: 7955-7962.
- Tart A.H., Blanks M.J. y Wozniak D.J. (2006)** The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *J. Bacteriol.* **188**: 6483-6489.
- Teitzel G.M., Geddie A., De Long S.K., Kirisits M.J., Whiteley M. y Parsek M.R. (2006)** Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**: 7242-7256.
- Terashima H., Kojima S. y Homma M. (2008)** Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **270**: 39-85.
- Thomas D.R., Morgan D.G. y DeRosier D.J. (1999)** Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotary motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 10134-10139.
- Thompson J.N. y Cunningham B.M. (2002)** Geographic structure and dynamics of coevolutionary selection. *Nature.* **417**: 735-788.
- Thormann K.M. y Paulick A. (2010)** Tuning the flagellar motor. *Microbiol.* **156**: 1275-1283.

- Totten P.A., Lara J.C. y Lory S. (1990)** The *rpoN* gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is required for expression of diverse genes, including the flagellin gene. *J. Bacteriol.* **172**: 389–396.
- Toutain C.M., Zegans M.E. y O'Toole G.A. (2005)** Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**: 771-777.
- Ude S., Arnold D.L., Moon C.D., Timms-Wilson T. y Spier, A.J. (2006)** Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environ. Microbiol.* **8**: 1997-2011.
- Ueno T., Oosawa K. y Aizawa S. (1992)** M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. *J. Mol. Biol.* **227**: 672-677.
- Uren N.C. (2007)** Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. In *The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, ed. R Pinton, Z Varanini, P Nannipieri, Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group, pp. 1–21.
- Valverde C., Lindell M., Wagner E.G.H. y Haas D. (2004)** A repeated GGA motif is critical for the activity and stability of the riboregulator *rsmY* of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biol. Chem.* **279**: 25066-25074.
- van den Broek D., Chin-A-Woeng T.F.C., Eijkemans K., Mulders I.H., Bloemberg G.V. y Lugtenberg B.J.J. (2003)** Biocontrol traits of *Pseudomonas* spp. are regulated by phase variation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 1003-1012.
- van den Broek D., Bloemberg G.V. y Lugtenberg B. (2005)** The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* Bacteria. *Environ. Microbiol.* **7**: 1686-1697
- Van Loon L.C. (2007)** Plant responses to plant growth-promoting bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**: 243-254.
- Van Luijk A. (1938)** Antagonism between various microorganisms and different species of the genus *Pythium*, parasitizing upon grasses and lucerne. *Mededelingen van het Phytopathologisch Laboratorium "Willie Commelin Scholten"- Baarn*, **14**: 43-83.
- Vander Wauven C., Piérard A., Kley-Raymann M., y Haas D. (1984)** *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J. Bacteriol.* **160**: 928-934.
- Vasseur P., Vallet-Gely I., Soscia C., Genin S. y Filloux A. (2005)** The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiol.* **151**: 985–997.
- Ventre I., Goodman A.L., Valley-Gely I., Vasseur P., Soscia C., Molin S., Bleves S., Lazdunski A., Lory S. y Filloux A. (2006)** Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**: 171-176.
- Villacieros M., Power B., Sánchez-Contreras M., Lloret J., Oruezabal R.I., Martín M. Fernández-Piñas F., Bonilla I., Whelan C., Dowling D.N. y Rivilla R. (2003)** Colonization behaviour of *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*) rhizosphere. *Plant Soil.* **251**: 47-54.

- Villacieros M., Whelan C., Mackova M., Molgaard J., Sánchez-Contreras M., Lloret J., Aguirre de Cárcer D., Oruezábal R.I., Bolaños L., Macek T., Karlson U., Dowling D.N., Martín M. y Rivilla R. (2005) Polychlorinated biphenyl rhizoremediation by *Pseudomonas fluorescens* F113 derivatives, using a *Sinorhizobium meliloti* nod system to drive *bph* gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2687-2694.
- Wadhams G.H. y Armitage J.P. (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 1024-1037.
- Wei B.L., Brun-Zinkernagel A.M., Simecka J.W., Pruss B.M., Babitzke P. y Romeo T. (2001) Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **40**: 245-256.
- Welch M., Oosawa K., Aizawa S.I. y Eisenbach M. (1993) Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 8787-8791.
- Weller D.M. (1988) Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **26**: 379-407.
- Whistler C.A., Corbell N.A., Sarniguet A., Ream W. y Loper J.E. (1998) The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor σ^S and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* **180**: 6635-6641.
- Whitchurch C.B., Leech A.J., Young M.D., Kennedy D., Sargent J.L., Bertrand J.J., Semmler A.B., Mellick A.S., Martin P.R., Alm R.A., Hobbs M., Beatson S.A., Huang B., Nguyen L., Commolli J.C., Engel J.N., Darzins A. y Mattick J.S. (2004) Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **52**: 873-893.
- Whitehead N.A., Barnard A.M., Slater H., Simpson N.J. y Salmond G.P. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 365-404.
- Willis D.K., Holmstadt J.J. y Kinscherf T.G. (2001) Genetic evidence that loss of virulence associated with *gacS* or *gacA* mutations in *Pseudomonas syringae* B728a does not result from effects on alginate production. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1400-1403.
- Wilson K.J., Sessitsch A., Corbo J.C., Giller K.E., Akkermans A.D. y Jefferson, R.A. (1995) beta-Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Microbiol.* **141**: 1691-1705.
- Wolfe A.J. y Berg H.C. (1989) Migration of bacteria in semisolid agar. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 6973-6977.
- Wolfe A.J. y Visick K.L. (2008) Get the message out: cyclic-di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J. Bacteriol.* **190**: 463-475.
- Wolk C.P., Cai Y.P. y Panoff J.M. (1991) Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5355-5359.
- Workentine M.L., Chang L., Ceri H. y Turner R.J. (2009) The GacS–GacA two-component regulatory system of *Pseudomonas fluorescens*: a bacterial two-hybrid analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **292**: 50-56.

- Wozniak D.J. y Ohman D.E. (1994)** Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* genes *algR*, *algB*, and *algD* reveals a hierarchy of alginate gene expression which is modulated by *algT*. *J. Bacteriol.* **176**: 6007-6014.
- Wu J. y Newton A. (1997)** Regulation of the *Caulabacter* flagellar gene hierarchy; not just for motility. *Mol. Microbiol.* **24**: 233-239.
- Yamaguchi S., Aizawa S., Kihara M., Isomura M., Jones C.J. y Macnab R.M. (1986)** Genetic evidence for a switching and energytransducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **168**: 1172-1179.
- Yonekura K., Maki S., Morgan D.G., DeRosier D.J., Vonderviszt F., Imada K. y Namba K. (2000)** The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science*. **290**: 2148-2152.
- Yorimitsu T., Mimaki A., Yakushi T. y Homma M. (2003)** The conserved charged residues of the C-terminal region of FliG, a rotor component of the Na⁺-driven flagellar motor. *J. Mol. Biol.* **334**: 567-583.
- Young G.M., Smith M.J., Minnich S.A. y Miller V.L. (1999)** The *Yersinia enterocolitica* motility master regulatory operon, *flhDC*, is required for flagellin production, swimming motility, and swarming motility. *J. Bacteriol.* **18**: 2823-2833.
- Yousef-Coronado F., Travieso M.L. y Espinosa-Urgel M. (2008)** Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Lett.* **288**: 118-124.
- Zehnder G., Kloepper J., Yao C. y Wei G. (1997)** Induction of systemic resistance against cucumber beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) by plant growth-promoting rhizobacteria. *J. of Econ. Entomol.* **90**: 391-396.
- Zhang Z.G. y Pierson L.S. (2001)** A second quorum-sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4305-4315.
- Zhou J., Lloyd S.A. y Blair D.F. (1998)** Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 6436-6441.
- Zuber S., Carruthers F., Keel C., Mattart A., Blumer C., Pessi G., Gigot-Bonnefoy C., Schnider-Keel U., Heeb S., Reimann C. y Haas D. (2003)** GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 634-644.